



Adalberto Filomeno **Aplicação de Métodos Quimiométricos aos Resultados**
Carvalho Santos Vieira **de Técnicas Hifenadas para Caracterização da**
 Aguardente de Cana-de-açúcar de Cabo Verde



**Adalberto Filomeno
Carvalho Santos Vieira**

**Aplicação de Métodos Quimiométricos aos Resultados
de Técnicas Hifenadas para Caracterização da
Aguardente de Cana-de-açúcar de Cabo Verde**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em “Métodos Instrumentais e Controlo da Qualidade Analítica” realizada sob a co-orientação científica do Doutor João Oliveira, Professor Associado do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e do Doutor Armando Duarte, Professor Catedrático do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

“A Deus pela onnipresença e compaixão... e aos meus pais e irmão Miguel pelo apoio de sempre!”

o júri

presidente

Prof. Doutora Maria Teresa Gomes
professora associada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor João António Baptista Pereira de Oliveira
professor associado do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Armando da Costa Duarte
professor catedrático do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Joaquim Carlos Gomes Esteves da Silva
professor associado da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

agradecimentos

A realização deste trabalho não seria possível sem a ajuda e colaboração de diversas pessoas, a quem endereço os meus mais sinceros agradecimentos, nomeadamente:

Aos Professores do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, Doutores João Oliveira e Armando Duarte, pela orientação dos mesmos, paciência, crítica e disponibilidade demonstradas ao longo de todas as fases deste presente trabalho;

À Eng. Anabela Cachada, pela indescritível ajuda, atenção e prestabilidade demonstradas na parte experimental;

À Doutora Ludovina Galego, Professora Adjunta da Escola Superior de Tecnologia da Universidade do Algarve, pelos esclarecimentos e apoio sempre prestado à minha pessoa.

A todas as outras pessoas que directa ou indirectamente contribuíram para a realização deste trabalho.

palavras-chave

Aguardente de cana-de-açúcar, cachaça, técnica hifenada, GC-MS, Quimiometria, SPME, análise multivariada, ésteres, álcool isoamílico, compostos voláteis.

resumo

Este trabalho teve como objectivo identificar os diferentes compostos presentes no “*head-space*” de duas variedades de aguardente de cana-de-açúcar (aguardente de cana-de-açúcar de Cabo Verde (nunca antes estudada) e aguardente de cana-de-açúcar brasileira (“*cacheça*”), quantificar alguns dos compostos mais relevantes para o aroma das mesmas e utilizar a análise multivariada no sentido de averiguar a formação de eventuais grupos distintos por parte das mesmas aguardentes.

A aguardente de cana-de-açúcar de Cabo Verde é a bebida espirituosa mais consumida em Cabo Verde desde os primórdios da colonização, com especificidades próprias ao nível do processo produtivo e da própria cana-de-açúcar utilizada. Contudo, parece não haver nenhum estudo sobre a sua composição, nomeadamente sobre os compostos responsáveis pelo seu aparente distinto aroma da cachaça.

Várias amostras ($n=16$) de aguardente de cana-de-açúcar (brasileiras e cabo-verdianas) foram analisadas quantitativa e qualitativamente utilizando a *Micro-extracção em Fase Sólida, HS-SPME* (do inglês, *Head-space Solid Phase Microextraction*) como método de extracção dos compostos voláteis, com subsequente análise por *Cromatografia Gasosa – Espectrometria de Massa, GC-MS* (do inglês, *Gas Chromatography – Mass Spectrometry*).

Foram identificados 31 compostos voláteis no “*head-space*” da aguardente de cana-de-açúcar de Cabo Verde e 35 compostos voláteis no “*head-space*” da cachaça.

O tratamento dos resultados obtidos da análise quantitativa mostrou uma diferença significativa entre a aguardente de cana-de-açúcar de Cabo Verde e a cachaça no que concerne ao teor do álcool isoamílico. O mesmo tratamento dos resultados mostrou também que os dois tipos de aguardente de cana-de-açúcar não apresentam concentrações significativamente diferentes no que concerne aos quatro ésteres em estudo (hexanoato de etilo, octanoato de etilo, nonanoato de etilo e oleato de etilo).

Devido à diferença significativa entre as duas variedades de aguardente de cana-de-açúcar no que concerne ao teor de álcool isoamílico, verificou-se que uma simples representação gráfica do mesmo nas amostras, pode distinguir as duas variedades de aguardente de cana-de-açúcar.

A Análise em Componentes Principais mostrou uma perceptível separação das duas variedades aguardentes de cana-de-açúcar em estudo. Igualmente, A Análise Hierárquica de Grupos utilizando o *método do vizinho mais afastado* e distância euclidiana, mostrou também uma clara separação das duas variedades de aguardente de cana-de-açúcar em estudo.

keywords

Sugar cane spirit, cachaça, hyphenated techniques, GC-MS, Chemometrics, SPME, multivariate analysis, esters, isoamyl alcohol, volatiles compounds.

abstract

The aim of this work is to identify several compounds present in the head-space of two kinds of sugar cane spirits (cape verdean sugar cane spirit (never studied before) and brazilian sugar cane spirit (“*cachaça*”) and quantify some of them with subsequent multivariate analysis of the results.

The cape verdean sugar cane spirit (“Grogó”) is the most consumed spirit in Cape Verde since the colonial times. In spite of it's importance, apparently no study has been done yet about it's aroma characterization, which seems to be distinct from that from cachaça due probably to some differences on their production process and raw material.

Several (n=16) sugar cane spirits samples (cape verdean and brazilian) were analyzed in quantitatively and qualitatively mode. The analysis was carried out using *HS-SPME* (*Head-space Solid Phase Microextraction*) as extraction method, with subsequent analysis by *GC-MS* (*Gas Chromatography – Mass Spectrometry*).

31 volatiles compounds were identified in cape verdean sugar cane spirit “*head-space*” while 35 volatiles compounds were identified in brazilian sugar cane spirit “*head-space*”.

The treatment of data obtained from quantitative analysis showed that the two kinds of sugar cane spirits have significant difference in isoamyl alcohol content. However, the same treatment also showed that there's no significant difference between the two kinds of sugar cane spirits in ethyl hexanoate, ethyl octanoate, ethyl nonanoate and ethyl oleate contents.

It was observed that an easy graphical representation of isoamyl concentration in the samples can well distinguish and separate the two kinds of sugar cane spirits.

The Principal Components Analysis (PCA) and the Hierarchical Cluster Analysis (furthest neighbour; euclidian distance) showed a clear separation of the two kinds of sugar cane spirit in distinct groups, proving that instrumental analysis conjugated with multivariate analysis can be an important tool to differentiate the two kinds of sugar cane spirits.

Índice Geral

Capítulo 1	1
Introdução.....	1
1.1 Objectivos	2
1.2 Estrutura do trabalho	3
Capítulo 2	5
Aplicação de Técnicas Hifenadas para Caracterização da Aguardente de Cana-de-açúcar	5
2.1 As técnicas hifenadas.....	5
2.1.1 – Aplicação de técnicas hifenadas para caracterização da aguardente de cana-de-açúcar	5
2.1.1.1. – Comparação de técnicas hifenadas mais utilizadas para análise de compostos voláteis da aguardente de cana-de-açúcar	6
2.1.1.1.1 – HPLC-DAD vs GC-MS, GC-FID.....	6
2.2 – Caracterização da aguardente de cana-de-açúcar	7
2.2.1 – Compostos predominantemente responsáveis pelo aroma da aguardente de cana-de-açúcar	8
2.2.1.1. - Outros compostos responsáveis pelo aroma da aguardente de cana-de-açúcar.....	9
2.2.1.2. – Técnicas de preparação da amostra para análise de compostos voláteis por Cromatografia Gasosa responsáveis pelo aroma da aguardente de cana-de-açúcar.....	10
2.2.1.2.1. – A SPME (Micro-extracção em Fase Sólida).....	11
2.2.1.2.1.1. – Efeito da temperatura e da força iónica nas eficiências de extracção.....	15
2.3 – Análise da aguardente de cana-de-açúcar por GC-MS.....	17
2.3.1. – Padrão-interno para análise de compostos voláteis da aguardente por GC-MS	17
2.3.2 – Compostos voláteis maioritários detectados no " <i>head-space</i> " da aguardente da cana-de-açúcar pelas análises GC-MS	18
Capítulo 3	22
Aplicação da análise multivariada para classificação de aguardente de cana-de-açúcar e outras bebidas alcoólicas.....	22

3.1 – A análise multivariada	22
3.1.1. – Técnicas de reconhecimento de padrões (com e sem supervisão)	22
3.1.1.1 - Análise em Componentes Principais, <i>PCA</i> (do inglês, " <i>Principal Components Analysis</i> ").....	23
3.1.1.1.1 – Critérios para determinação do número de componentes principais a reter numa determinada análise	25
a) <i>Critério de Kaiser</i>	25
b) <i>Critério baseado no diagrama de vectores próprios</i>	26
c) <i>Critério baseado nos factores interpretáveis</i>	26
d) <i>Método de simulação de Lébart</i>	26
3.1.1.2 – Análise em Componentes Principais vs Análise de Grupos (Análise de <i>Clusters</i> ou " <i>Cluster Analysis</i> ")	27
3.1.1.3. – Análise em Componentes Principais vs Análise Factorial.....	27
3.1.1.3 – <i>Softwares</i> de análise multivariada	28
3.1.2 – Aplicação de métodos quimiométricos para caracterização de bebidas alcoólicas.....	28
 Capítulo 4	39
Material e Métodos	39
 4.1 – Amostras.....	39
4.1.1 – Preparação dos padrões para a curva de calibração	39
4.1.1.1 – Limite de Detecção, <i>LOD</i> (do inglês, <i>Limit of Detection</i>).....	40
4.1.2 – Preparação da Amostra	40
4.2 – Extração por SPME	41
4.3 – Análises por GC-MS.....	42
4.3.1 – Análises Qualitativas (análises em modo de <i>Varrimento</i> (" <i>Scan</i> ").....	42
4.3.2 – Análises Quantitativas (análises em modo de <i>Monitoramento Iónico Selectivo</i> , " <i>SIM</i> " (do inglês, <i>Selected Ion Monitoring</i>)	42
4.4 – Análise Multivariada	43
 Capítulo 5	44
Resultados e Discussão	44
 5.1 – Análise Qualitativa	44

5.1.1 – Análise qualitativa às amostras de aguardente de cana-de-açúcar de Cabo Verde ...	44
5.1.2 – Análise qualitativa às amostras de aguardente de cana-de-açúcar brasileira	48
5.1.3 – Comparação Aguardente de cana-de-açúcar de Cabo Verde/Cachaça	51
5.2 – Análise Quantitativa	56
5.2.1 – Curvas de calibração	56
5.2.2 – Resultados das análises às amostras de aguardente de cana-de-açúcar de Cabo Verde e aguardente de cana-de-açúcar brasileira.	56
5.2.2.1. – Médias e coeficientes de variação.....	58
5.2.2.2. – Gráficos de caixa ("box plot").....	59
5.2.2.2.1 – Álcool isoamílico	59
5.2.2.2.2 – Hexanoato de etilo	60
5.2.2.2.3 – Octanoato de etilo	61
5.2.2.2.4 – Nonanoato de etilo	62
5.2.2.2.5 – Oleato de etilo.....	63
5.2.2.3 – Análise Multivariada.....	64
5.2.2.3.1 – Análise em Componentes Principais	64
5.2.2.3.2 – Análise Hierárquica de Grupos	70
Capítulo 6	72
Conclusões e Considerações Finais	72
Referências Bibliográficas	76
Anexos	81

Índice de Figuras

Capítulo 2

Fig. 2.1 – Planta da cana-de-açúcar (A), caldo de cana-de-açúcar fermentando (B) e alambique de cobre com pré-aquecedor para destilação do caldo fermentado da cana-de-açúcar (C) (Oliveira <i>et al.</i> , 2005).....	7
Fig. 2.2 – Comparação do teor de cetonas na aguardente de cana-de-açúcar e no rum	8
Fig. 2.3 – Formação do acetal 1,1-dietoxi-etano a partir do acetaldeído e etanol (Nóbrega, 2003).....	10
Fig. 2.4 – (A) Vista interna do dispositivo de SPME com a fibra exposta; (B) vista com a fibra exposta e o êmbolo travado pelo pino no centro da fenda em “Z”.....	12
Fig. 2.5 – Aplicações da SPME.....	13
Fig. 2.6 – Concentração dinâmica do “ <i>head-space</i> ” da cachaça em Tenax-TA (Nóbrega, 2003).....	14
Fig. 2.7 – Efeitos das diferentes concentrações de cloreto de sódio nas eficiências de extracção de acetato de etilo (◇) e dos álcoois: 1-propil (■), isobutil (▲), 1-butil (*) e isoamílico (●).....	16
Fig. 2.8 – Efeitos das diferentes temperaturas nas eficiências de extracção de acetato de etilo (◇) e dos álcoois: 1-propil (■), isobutil (▲), 1-butil (*) e isoamílico (●)	17
Fig. 2.9 – Cromatograma iónico total do “ <i>head-space</i> ” da aguardente de cana-de-açúcar obtido por Nóbrega (2003).	19
Fig. 2.10 – Compostos identificados por Nonato <i>et al.</i> (2001) por GC-FID no “ <i>Head-space</i> ” da aguardente de cana-de-açúcar.....	20
Fig. 2.11 – Cromatograma parcial da aguardente de cana-de-açúcar analisada por GC-FID usando uma coluna capilar <i>HP-FAP</i>	21

Capítulo 3

Fig. 3.1 – Análise em Componentes Principais para as amostras de vinho da madeira efectuada por Câmara <i>et al.</i> (2006).	29
--	----

Fig. 3.2 – <i>Score plot</i> de amostras de vinhos no plano definido pelos dois primeiros componentes principais. (■) Barbera Oltrepó Pavese; (●) Barbera Piemonte; (*) Barbera Asti; (▲) Barbera Alba.....	30
Fig. 3.3 – Representação gráfica de PC1 vs PC2 para as concentrações de aniões acetato, cloreto, nitrato, sulfato e oxalato em tequilas estudadas por Lachenmeier <i>et al.</i> , 2005.....	31
Fig. 3.4 - Representação gráfica de PC1 vs PC2 para os compostos voláteis presentes nas tequilas (metanol, acetato de etilo, 1-propanol, isobutanol e 2-/3-metil-1-butanol, determinados em 38 amostras de tequila usando a espectroscopia de FTIR).....	32
Fig. 3.5 – Análise em Componentes Principais para as amostras de cachaça.....	33
Fig. 3.6 – Análise de Grupos efectuada para as amostras de cachaça por Fernandes <i>et al.</i> (2005).....	34
Fig. 3.7 – Análise em Componentes Principais dos dados correspondentes a teores de antocianinas e análise sensorial de vinhos tintos gregos.....	35
Fig. 3.8 – Análise em Componentes Principais dos dados correspondentes a teores de miricetina, ácido gálico, ácido p-coumarico (fenol) e Zn^{2+} (mineral).....	35
Fig. 3.9 – Figura bidimensional da Análise em Componentes Principais das aguardentes envelhecidas e comerciais. Tempo de envelhecimento em meses. A = amostra comercializada recém-destillada; B = amostra comercializada envelhecida.....	36
Fig. 3.10 - Análise em Componentes Principais realizada para as amostras de bebidas espirituosas.....	37
Fig. 3.11 - Análise em Componentes Principais realizada para as amostras de cervejas por Lachenmeier (2006).....	38

Capítulo 4

Fig. 4.1 – Extracção de compostos voláteis por HS-SPME.....	41
---	----

Capítulo 5

Fig. 5.1 – Cromatograma da análise da aguardente de cana-de-açúcar de Cabo Verde por injeção directa.....	45
Fig. 5.2 – Cromatograma da aguardente de cana-de-açúcar de Cabo Verde obtido pela análise por HS-SPME/GC-MS.....	47
Fig. 5.3 – Cromatograma da aguardente de cana-de-açúcar brasileira obtido por HS-	50

SPME/GC-MS	
Fig. 5.4 – Estrutura molecular da 6,10,14-Trimetil-2-pentadecanona	55
Fig. 5.5 – Gráfico de caixa para a concentração do álcool isoamílico.....	59
Fig. 5.6 – Gráfico de caixa para a concentração do hexanoato de etilo.....	60
Fig. 5.7 – Gráfico de caixa para a concentração do octanoato de etilo.....	61
Fig. 5.8 – Gráfico de caixa para a concentração do nonanoato de etilo.....	62
Fig. 5.9 – Gráfico de caixa para a concentração de oleato de etilo.....	63
Fig. 5.10 – Representação gráfica das concentrações do álcool isoamílico nas amostras de aguardente de cana-de-açúcar.....	64
Fig. 5.11 – Representação gráfica da relação entre os componentes.....	67
Fig. 5.12 – " <i>Loadings</i> "para os três primeiros componentes principais.....	67
Fig. 5.13 – Representação gráfica de PC1 vs PC2 vs PC3.....	69
Fig.5.14 – Dendograma obtida pela Análise Hierárquica de Grupos para as amostras em estudo.....	70

Índice de Tabelas

Capítulo 4

Tabela 4.1 – Preparação da solução <i>stock</i> global A.....	39
Tabela 4.2 – Preparação dos padrões para a curva de calibração.....	40

Capítulo 5

Tabela 5.1 – Compostos identificados pela análise da aguardente de cana-de-açúcar de Cabo Verde por injeção directa	45
Tabela 5.2 – Compostos identificados no " <i>head-space</i> " da aguardente de cana-de-açúcar de Cabo Verde.....	46
Tabela 5.3 – Compostos identificados no " <i>head-space</i> " da aguardente de cana-de-açúcar brasileira.....	49
Tabela 5.4 – Compostos químicos identificados não referenciados por Nonato <i>et al.</i> (2001) e Nóbrega (2003) como estando presentes no " <i>head-space</i> " da cachaça.....	52
Tabela 5.5 – Compostos detectados no " <i>head-space</i> " da aguardente de cana-de-açúcar de Cabo Verde e ausentes nas cachaças analisadas.....	53
Tabela 5.6 – Parâmetros das curvas de calibração e limites de detecção para o álcool isoamílico, o hexanoato de etilo, o octanoato de etilo, o nonanoato de etilo e o oleato de etilo.....	56
Tabela 5.7 – Resultados das análises às amostras de aguardente de cana-de-açúcar de Cabo Verde e aguardente de cana-de-açúcar brasileira com os respectivos desvios-padrão relativos, <i>RSD</i> (do inglês, <i>Relative Standard Deviation</i>) (valor médio± <i>RSD</i>).....	58
Tabela 5.8 – Médias das concentrações e respectivos coeficientes de variação (média±CV) dos compostos em estudo nas duas variedades de aguardente de cana-de-açúcar.....	59
Tabela 5.9 – Tabela original dos resultados obtidos com as médias e desvios-padrão.....	65
Tabela 5.10 – Componentes principais, respectivos valores próprios e % de variância explicada.....	66

Tabela 5.11 – <i>Scores</i> para o primeiro, segundo e terceiro componente principal para as 14 amostras de aguardente de cana-de-açúcar.....	68
Tabela 5.12 – Análise Hierárquica de Grupos para as amostras em estudo.....	70

Capítulo 1

Introdução

Os trabalhos realizados (p. ex. Nonato *et al.*, 2001 e Nóbrega, 2003) até ao momento relativos à utilização das técnicas hifenadas para caracterização de bebidas espirituosas produzidas a partir de cana-de-açúcar cingiram-se principalmente na utilização de Cromatografia Gasosa – Espectrometria de Massa, *GC-MS* (do inglês, *Gas Chromatography – Mass Spectrometry*) para determinação de compostos voláteis presentes no rum e na cachaça (aguardente de cana-de-açúcar brasileira).

Entretanto, actualmente, parece não haver ainda, qualquer estudo relativo à determinação dos compostos voláteis presentes na aguardente de cana-de-açúcar de Cabo Verde (“grogó”, em crioulo), o qual aparentemente devido ao tipo de cana-de-açúcar e a ligeiras diferenças no processo de fabrico, aparenta ter um aroma diferente do da aguardente de cana-de-açúcar brasileira (“cachaça”). Como o aroma de um alimento é determinado pela presença em determinadas concentrações de certos compostos voláteis no seu “*head-space*” (Nóbrega, 2003), é de supor que a aparente diferença no que concerne ao aroma, da aguardente de cana-de-açúcar de Cabo Verde em relação à aguardente de cana-de-açúcar brasileira se deva à ausência ou presença de compostos voláteis característicos (ou que não sendo característicos estejam em concentrações significativamente diferentes) no seu “*head-space*”.

Os ésteres e o álcool terciário isoamílico são em larga medida, os compostos voláteis primariamente responsáveis pelo aroma das bebidas espirituosas produzidas a partir da cana-de-açúcar. De entre os ésteres, os etílicos são os mais importantes devido ao facto de estarem presentes em concentrações relativamente elevadas, terem um baixo valor de limiar de odor e um cheiro agradável (Nóbrega, 2003).

O álcool terciário isoamílico, apesar de ter um elevado valor de limiar de odor, contribui marcadamente para o aroma das bebidas espirituosas produzidas a partir da cana-de-açúcar, uma vez que se encontra em concentração relativamente elevada no “*head-space*” das mesmas (Nóbrega, 2003).

Assim sendo, o conhecimento das características químicas relativas ao “*head-space*” da aguardente de cana-de-açúcar de Cabo Verde, nomeadamente as concentrações em que se encontram o álcool terciário isoamílico e certos ésteres etílicos

como o hexanoato de etilo, o octanoato de etilo, o nonanoato de etilo e o oleato de etilo, poderá dar um contributo significativo à diferenciação da mesma em relação à cachaça e ao incremento da sua comercialização como um produto único e característico do Arquipélago de Cabo Verde.

1.1 Objectivos

Tendo em consideração a lacuna existente no conhecimento dos compostos voláteis presentes no "*head-space*" da aguardente de cana-de-açúcar de Cabo Verde responsáveis pelo seu aparente distinto aroma em relação à aguardente de cana-de-açúcar brasileira e considerando o contributo que um estudo dos mesmos compostos (nomeadamente as concentrações em que alguns deles se encontram), poderia trazer a uma eventual futura certificação da aguardente de cana-de-açúcar de Cabo Verde, como uma aguardente única e típica de Cabo Verde, estabeleceu-se o plano de trabalhos que conduziu à presente dissertação.

Em termos de objectivos a atingir, podem ser considerados os seguintes:

- ✓ Identificar os compostos voláteis presentes no "*head-space*" de diversas amostras aguardente de cana-de-açúcar de Cabo Verde;
- ✓ Quantificar o álcool terciário isoamílico e quatro ésteres (hexanoato de etilo, octanoato de etilo, nonanoato de etilo e oleato de etilo) presentes no "*head-space*" da aguardente de cana-de-açúcar de Cabo Verde;
- ✓ Identificar os compostos voláteis presentes no "*head-space*" de diversas amostras aguardente de cana-de-açúcar brasileira;
- ✓ Quantificar o álcool terciário isoamílico e quatro ésteres (hexanoato de etilo, octanoato de etilo, nonanoato de etilo e oleato de etilo) presentes no "*head-space*" da aguardente de cana-de-açúcar brasileira;

- ✓ Utilizar técnicas de análise multivariada para verificar uma eventual formação de grupos distintos por parte das duas aguardentes de cana-de-açúcar com base nos valores relativos aos teores do álcool isoamílico, hexanoato de etilo, octanoato de etilo, nonanoato de etilo e oleato de etilo.

1.2 Estrutura do trabalho

O presente trabalho encontra-se organizado em 6 Capítulos. O Capítulo 1, que corresponde à introdução, descreve os objectivos do estudo, a sua importância e a estrutura do trabalho.

No Capítulo 2 faz-se uma breve abordagem sobre os fundamentos das técnicas hifenadas, uma ampla abordagem sobre os trabalhos realizados relativos à utilização das técnicas hifenadas para caracterização da aguardente de cana-de-açúcar e sobre os compostos voláteis predominantes no "*head-space*" da aguardente de cana-de-açúcar responsáveis pelo aroma da mesma. Por último, aborda-se também com algum pormenor a técnica de preparação da amostra utilizada neste trabalho, a Micro-extracção em Fase Sólida, **SPME** (do inglês ***S**olid **P**hase **M**icroextraction*).

No Capítulo 3 faz-se uma abordagem das técnicas de análise multivariada, nomeadamente as técnicas de reconhecimento de padrões com e sem supervisão. Em relação às técnicas de reconhecimento de padrões sem supervisão, põe-se ênfase na Análise em Componentes Principais e faz-se uma ampla abordagem sobre os diversos trabalhos respeitantes à utilização da mesma para classificação de diversas bebidas espirituosas.

No capítulo 4 apresentam-se os materiais sobre os quais se incidiu o presente trabalho (amostras de aguardente de cana-de-açúcar de Cabo Verde e do Brasil) e os métodos utilizados para a prossecução dos objectivos propostos (extracção de compostos voláteis por *HS-SPME* ("*Head-space*"-*SPME*) e análises dos mesmos por *GC-MS* no modo de varrimento e *SIM*.

No capítulo 5 apresenta-se e discute-se os resultados obtidos das análises por HS-SPME/GC-MS e aplica-se técnicas de análise multivariada (nomeadamente a Análise em Componentes Principais e a Análise de Grupos) aos resultados relativos aos teores de álcool isoamílico, hexanoato de etilo, octanoato de etilo, nonanoato de etilo e oleato de etilo, discutindo-se de seguida, os resultados daí advenientes.

O Capítulo 6 integra as principais conclusões extraídas dos estudos realizados e propostas para futuras investigações.

Capítulo 2

Aplicação de Técnicas Hifenadas para Caracterização da Aguardente de Cana-de-açúcar

2.1 As técnicas hifenadas

O termo “*técnica hifenada*” tornou-se muito popular na década de 80 do século passado na Química Analítica (Exarchou *et al.*, 2005). De facto, a combinação de instrumentos com capacidade de separação cromatográfica com instrumentos capazes de providenciar dados estruturais (“*técnica hifenada*”) tem tido um enorme impacto na Química Analítica. Essa combinação constitui uma ferramenta analítica essencial em diversas áreas como, por exemplo, na monitorização ambiental (Christensen *et al.*, 2005; Kite *et al.*, 2003).

A combinação da cromatografia gasosa com detectores de massa foi conseguida há cerca de 50 anos atrás. A primeira combinação conseguida foi com o *analizador de sector magnético*. Contudo, actualmente os sistemas de GC-MS que usam o analisador de sector magnético são raros, sendo que o analisador mais utilizado é o filtro de massa “*quadrupolo*” desenvolvido por Paul nos anos 50 do século passado (Kite *et al.*, 2003).

A Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massa (GC-MS) e a Cromatografia Líquida-Espectrometria de Massa, *LC-MS* (do inglês, *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry*) estão entre as técnicas hifenadas frequentemente utilizadas para determinação de compostos voláteis da aguardente de cana-de-açúcar (Christensen *et al.*, 2005).

2.1.1 – Aplicação de técnicas hifenadas para caracterização da aguardente de cana-de-açúcar

Até ao momento, existem poucos trabalhos realizados relativos à identificação por técnicas hifenadas (nomeadamente a GC-MS) de compostos voláteis importantes para o aroma da aguardente. De entre os pioneiros, encontram-se alguns trabalhos como, por

exemplo, os desenvolvidos por Almeida & Barreto (1971) e Llistó *et al.* (1979). Entre os trabalhos mais recentes incluem-se, por exemplo, os trabalhos desenvolvidos por Nascimento *et al.* (2000), Nonato *et al.* (2001) e Nóbrega (2003).

2.1.1.1 – Comparação de técnicas hifenadas mais utilizadas para análise de compostos voláteis da aguardente de cana-de-açúcar

Existem alguns estudos nos quais se compararam algumas técnicas hifenadas, no que concerne à determinação de compostos voláteis na aguardente como, por exemplo, os realizados por Cardoso *et al.* (2003).

2.1.1.1.1 – HPLC-DAD vs GC-MS, GC-FID

Cardoso *et al.* (2003) compararam a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado ao detector "Diode-array", HPLC-DAD (do inglês, *High Performance Liquid Chromatography* – *Diode-array Detector*) com a Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização de Chama, GC-FID (do inglês, *Gas Chromatography – Flame Ionization Detector*) na determinação de compostos voláteis presentes no "head-space" da aguardente de cana-de-açúcar. Constataram que a HPLC-DAD apresenta algumas vantagens em relação ao GC-FID na determinação de alguns compostos voláteis presentes no "head-space" da aguardente de cana-de-açúcar como, por exemplo, as cetonas.

Cardoso *et al.* (2003) detectaram (na determinação de cetonas presentes na aguardente de cana-de-açúcar por GC-FID) problemas de co-eluição entre o etanol e o 2-butanona e entre a acetilacetona e o 5,5-dimetil-1,3-ciclohexanediona. Esses problemas de co-eluição foram eliminados analisando as cetonas na forma de 2,4-dinitrofenilhidrazonas por HPLC-DAD.

Entretanto, apesar de algumas desvantagens, as técnicas hifenadas como a GC-MS são amplamente utilizadas na análise de diversas bebidas alcoólicas destiladas. Encontram-se publicados alguns trabalhos como os de Nóbrega (2003) e Nonato *et al.* (2001). Nóbrega (2003) obteve bons resultados na determinação de compostos voláteis da aguardente de cana-de-açúcar por GC-MS.

2.2 – Caracterização da aguardente de cana-de-açúcar

As bebidas destiladas constituem uma mistura complexa de centenas de compostos em concentrações que vão desde mg.L^{-1} a ng.L^{-1} , numa matriz de *água-etanol* (Namara *et al.*, 2005).

A aguardente de cana-de-açúcar é uma bebida espirituosa produzida a partir da destilação do caldo de cana-de-açúcar fermentado (Fig. 2.1). A produção da aguardente de cana-de-açúcar atinge em alguns países como o Brasil, 2 bilhões de litros por ano, sendo que apenas menos de 1% desse total é exportado (Souza *et al.*, 2006).



Fig. 2.1 – Planta da cana-de-açúcar (A), caldo de cana-de-açúcar fermentando (B) e alambique de cobre com pré-aquecedor para destilação do caldo fermentado da cana-de-açúcar (C) (Oliveira *et al.*, 2005).

O conhecimento das propriedades sensoriais e químicas da aguardente de cana-de-açúcar, nomeadamente do seu aroma, pode dar um contributo importante aos esforços para o incremento da sua comercialização e exportação, e diferenciá-lo em relação à outra bebida destilada similar, o rum. A diferença entre a aguardente de cana-de-açúcar e o rum reside no facto de que a aguardente de cana-de-açúcar é feita a partir do caldo de cana-de-açúcar “bruto” fermentado, enquanto que o rum é feito a partir de caldo de cana-de-açúcar fervido, que depois de fermentado é destilado (Souza *et al.*, 2006).

Esse facto faz com que o rum e a aguardente de cana-de-açúcar tenham algumas propriedades físico-químicas diferentes (Souza *et al.*, 2006). Por exemplo, Cardoso *et al.* (2003) detectaram diferenças entre o rum e a aguardente de cana-de-açúcar (Fig. 2.2) no que concerne aos teores de algumas cetonas como a acetona, a acetofenona, a ciclopentanona e a 2,3-butanediona.

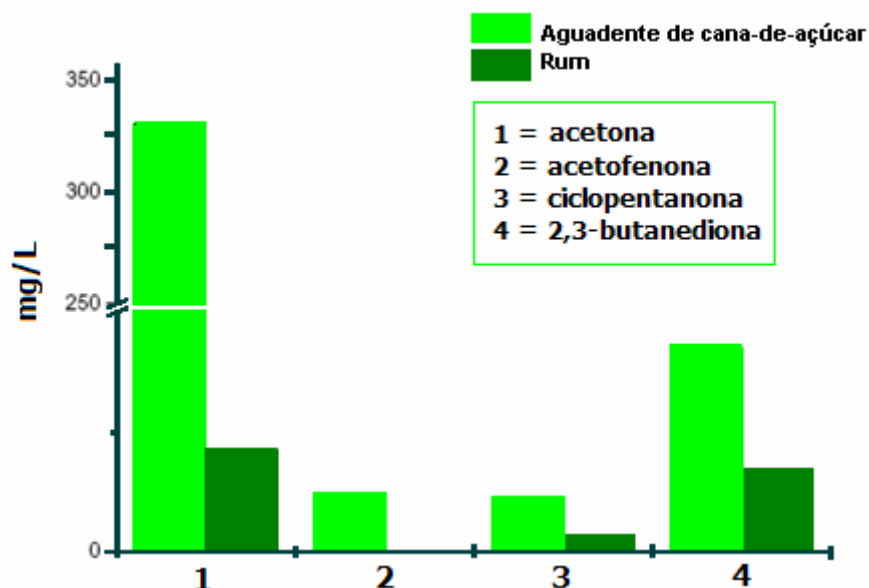


Fig. 2.2 – Comparação do teor de cetonas na aguardente de cana-de-açúcar e no rum.

2.2.1 – Compostos predominantemente responsáveis pelo aroma da aguardente de cana-de-açúcar

O aroma de um alimento está relacionado com a volatilidade de certos compostos químicos que fazem parte da sua constituição. O composto volátil maioritário nas bebidas alcoólicas é o etanol. Todavia, encontram-se em menores proporções, centenas de outros compostos como os ésteres (quantitativamente e qualitativamente constituem um dos maiores grupos da fracção volátil da aguardente de cana-de-açúcar), aldeídos e álcoois terciários que dão um grande contributo para o aroma da aguardente (Nóbrega, 2003).

Devido à sua especial influência no aroma, os ésteres contribuem em larga medida para a qualidade e aceitabilidade da aguardente de cana-de-açúcar. Os ésteres formam-se durante a fermentação pela reacção entre os ácidos e os álcoois produzidos durante o processo. O acetato de etilo é o éster mais abundante presente na aguardente de cana-de-açúcar (Nonato *et al.*, 2001).

2.2.1.1. - Outros compostos responsáveis pelo aroma da aguardente de cana-de-açúcar

O etanol devido ao seu elevado valor limiar de odor e ao seu aroma pouco marcante é provavelmente o composto que tem menor influência na definição e caracterização do aroma das bebidas alcoólicas (Nóbrega, 2003).

No "*head-space*" da cachaça, para além dos ésteres que se encontram maioritariamente, podem encontrar-se outros compostos que também dão um contributo importante para o aroma, como o álcool terciário 3-metil-1-butanol (álcool isoamílico). O álcool isoamílico forma-se durante a fermentação alcoólica devido ao catabolismo secundário nas leveduras de açúcares e aminoácidos (Nóbrega, 2003).

Nonato *et al.* (2001) detectaram concentrações relativamente elevadas de 3-metil-1-butanol em diversas aguardentes de cana-de-açúcar.

Apesar de ter um valor limiar de odor relativamente elevado (1000 ppb) em água, a contribuição do álcool isoamílico para o aroma final da aguardente de cana-de-açúcar tende a ser elevada (Nóbrega, 2003).

As concentrações dos compostos voláteis presentes no "*head-space*" das bebidas alcoólicas influenciam o odor das mesmas. Entretanto, quantidades elevadas podem modificar características de aroma consideradas "agradáveis" para "extremamente desagradáveis" (Nóbrega, 2003).

Outra classe de compostos presentes em concentrações relativamente elevadas no "*head-space*" da aguardente de cana-de-açúcar é a dos acetais, que se formam por reacção entre aldeídos e álcoois (Fig. 2.3). A reacção entre aldeídos e álcoois para formar acetais é responsável pela diminuição do odor "pungente" dos aldeídos nas bebidas alcoólicas (Nóbrega, 2003).

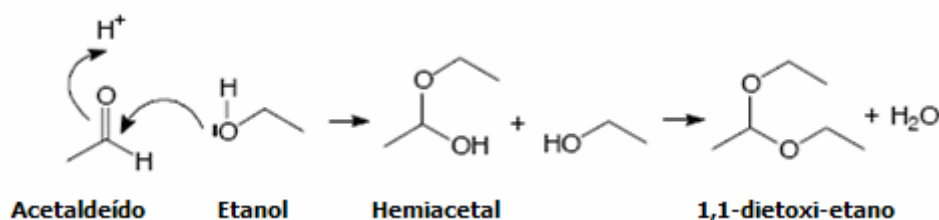


Fig. 2.3 – Formação do acetal 1,1-dietoxi-etano a partir do acetaldeído e etanol.

Um outro composto presente em quantidades muito baixas no "head-space" da aguardente de cana-de-açúcar (mas, importante para o aroma) é o composto sulfurado 4,5-de-hidro-2-metil-3(2H)-tiofenona, que se supõe formar-se através da fermentação do aminoácido sulfurado metionina ou de uma condensação *aldol* envolvendo acetaldeído e piruvaleído e subsequente reacção com H_2S , produzido por intermédio da hidrólise térmica ou *degradação de Strecker* do aminoácido sulfurado cisteína (Nóbrega, 2003).

2.2.1.2. – Técnicas de preparação da amostra para análise de compostos voláteis por Cromatografia Gasosa responsáveis pelo aroma da aguardente de cana-de-açúcar

Em geral um método analítico envolve vários processos como a amostragem, a preparação da amostra, a separação, a detecção e a análise de dados. Cerca de 80% do tempo da análise pode ser gasto só na amostragem e preparação da amostra (Gyorgy *et al.*, 2004).

A injeção directa de amostras de bebidas alcoólicas é apropriada para compostos secundários presentes em elevadas concentrações, mas inapropriada para análise de compostos presentes na aguardente de cana-de-açúcar em baixas concentrações (mas que são muito importantes para o aroma da aguardente de cana-de-açúcar). Para além disso, a injeção directa têm ainda outra desvantagem, que é o facto de conduzir basicamente à obtenção de informação da fase líquida da amostra, negligenciando informação relativa à fase gasosa (Nonato *et al.*, 2001).

A injeção directa das bebidas alcoólicas pode conduzir ainda, (devido ao elevado conteúdo em água das bebidas alcoólicas) à formação de picos largos e perturbação na estabilidade do sinal do detector acoplado ao aparelho de cromatografia (como o detector

de FID, por exemplo) (Nonato *et al.*, 2001).

Os métodos de preparação da amostra que usam solventes como a extracção *líquido-líquido* (frequentemente utilizada), tem várias desvantagens como o facto de serem morosos e utilizarem grandes quantidades de solventes tóxicos em várias etapas, que podem conduzir à perda de compostos voláteis. Além disso, a eficiência desses métodos pode ser reduzido por impurezas presentes nos solventes (Nonato *et al.*, 2001).

Nonato *et al.* (2001) compararam a extracção *líquido-líquido* com a *micro-extracção em fase sólida* (SPME, abordada em pormenor mais abaixo), utilizando nesta última uma fibra de poliacrilato de 85 μm . Após experiências, concluíram que ambos os métodos apresentavam grande linearidade. Contudo, mostraram que a reprodutibilidade para as análises em que se utilizava a SPME era melhor do que nas análises em que se utilizava a extracção *líquido-líquido*. Comprovaram também que as concentrações dos analitos eram mais elevadas para as análises em que se utilizava a SPME como método de extracção do que para as análises em que se utilizava a extracção *líquido-líquido* como método de extracção.

Uma vez que a injeção directa não é recomendada para análise de compostos voláteis na aguardente e a extracção *líquido-líquido* apresentar alguns problemas como o facto de poder conduzir à perda de voláteis, torna-se necessário proceder à preparação da amostra de aguardente de cana-de-açúcar para análise, utilizando outros métodos, como a SPME, por exemplo (Nonato *et al.*, 2001).

2.2.1.2.1. – A SPME (Micro-extracção em Fase Sólida)

A *Micro-extracção em Fase Sólida*, SPME (do inglês, "Solid-Phase Micro-extraction") é uma técnica que incorpora a extracção e concentração da amostra numa só etapa, sem que seja necessário qualquer solvente. Os analitos são directamente extraídos e concentrados na fibra de extracção (Gyorgy *et al.*, 2004).

As vantagens da SPME em relação a outros métodos de extracção como as *extracções líquido-líquido* (LLE) e *em fase sólida* (SPE) residem no facto de não ser necessário qualquer solvente (minimizando assim perdas de determinados compostos, nomeadamente, compostos voláteis), haver poupança de tempo de análise e melhoria dos limites de detecção (Gyorgy *et al.*, 2004).

A Fig. 2.4 representa o dispositivo de SPME constituído por uma secção de fibra de

sílica fundida (recoberta por um filme de sorvente ou adsorvente) e um microtubo de aço que são montados em um conjunto onde ficam protegidos por uma agulha hipodérmica de aço inox. O conjunto de fibra é montado no interior de um suporte similar em termos de forma e operação a uma seringa convencional (Gyorgy *et al.*, 2004; Valente & Augusto, 2000).

Na análise de compostos voláteis da aguardente, utiliza-se frequentemente a fibra de Polidimetilsiloxano (PDMS), a qual é mais adequada à análise de compostos voláteis (Gyorgy *et al.*, 2004).

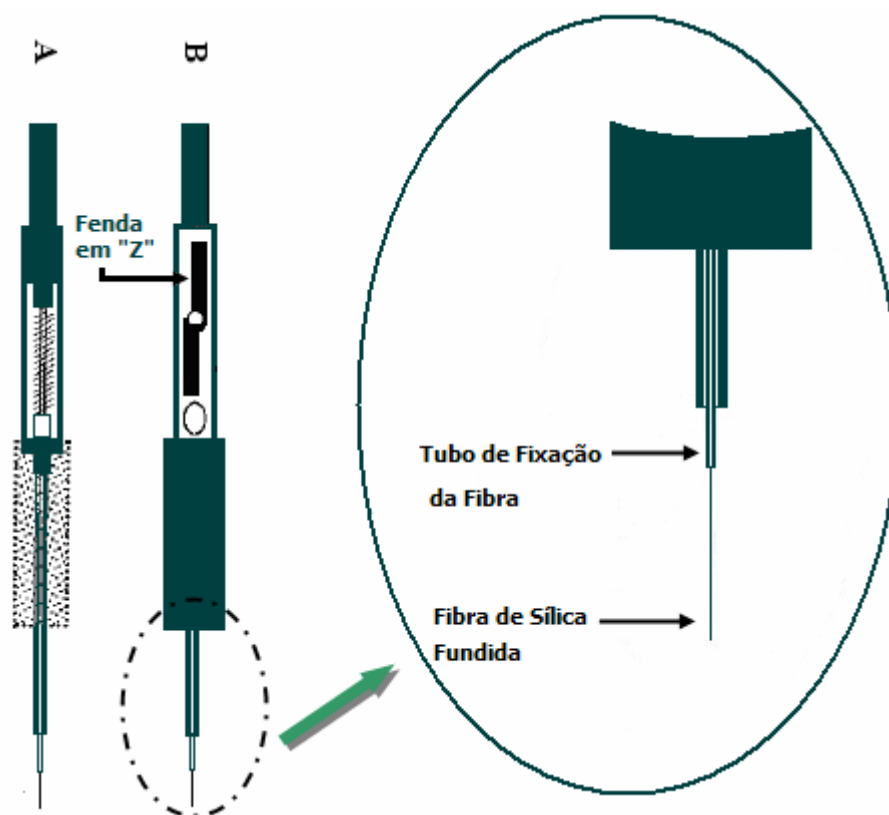


Fig. 2.4 – (A) Vista interna do dispositivo de SPME com a fibra exposta; (B) vista com a fibra exposta e o êmbolo travado pelo pino no centro da fenda em "Z".

Antes da utilização da fibra, deve-se proceder ao seu acondicionamento na porta do injetor do sistema de GC a uma determinada temperatura e durante um certo período de tempo, de acordo com as instruções do fabricante (Nonato *et al.*, 2001).

→ **Aplicações da SPME**

Existem duas aplicações para a SPME (Fig. 2.5): “*Head-space*” SPME (*HS-SPME*) e “*Direct Imersion*” SPME (*DI-SPME*) (Gyorgy *et al.*, 2004).

A escolha depende da polaridade e volatilidade dos analitos. Os compostos voláteis são mais convenientemente estudados por HS-SPME seguido de análise por GC-MS. Como não existe qualquer solvente (só o absorvido pela fibra), utiliza-se geralmente a injeção *splitless* (Gyorgy *et al.*, 2004).

Os compostos polares e não voláteis são mais frequentemente estudados por Imersão Directa (*DI-SPME*) (a fibra é imersa no líquido), seguido de análise por GC ou HPLC (Gyorgy *et al.*, 2004).

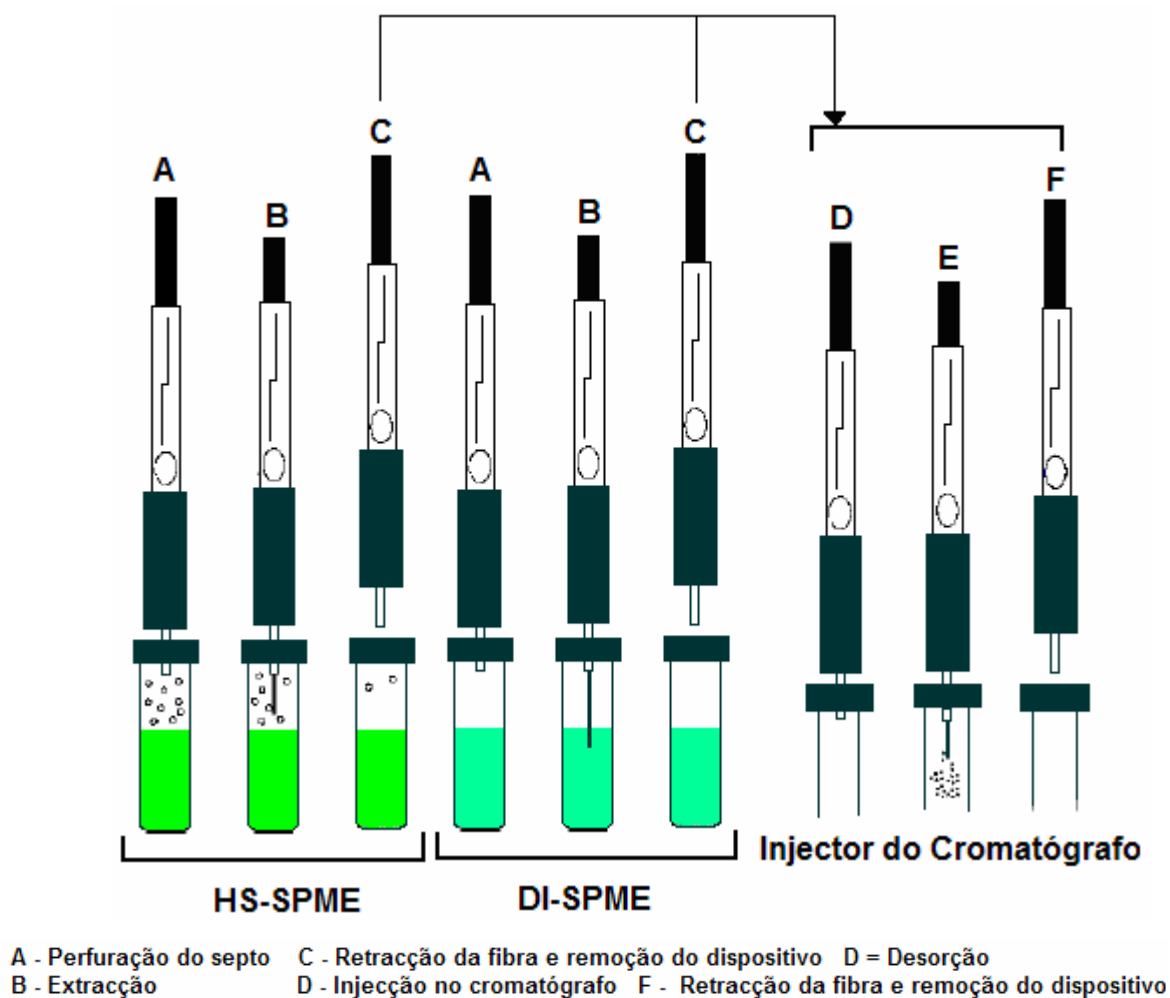


Fig. 2.5 – Aplicações da SPME (adaptado de Valente & Augusto, 2000).

No processo da SPME, os analitos distribuem-se entre a fase líquida e a fase gasosa da amostra. A quantidade de analito extraído depende do coeficiente de partição entre a amostra e o revestimento (Nonato *et al.*, 2001)

Na SPME, de entre os parâmetros mais importantes para uma óptima performance na extracção estão a polaridade da fibra, a espessura da fibra, o pH e a força iónica da amostra, o tempo adsorção/absorção e desorção, a temperatura de extracção, e a velocidade de agitação da amostra. Assim sendo, na SPME antes de se proceder à extracção é necessário estabelecer as condições óptimas para a extracção. A força iónica, por exemplo, pode ser variada através da adição de cloreto de sódio (Nonato *et al.*, 2001).

→ ***Outros métodos para extracção de compostos voláteis***

Um outro método utilizado para extracção de alguns compostos voláteis presentes no “*head-space*” da aguardente de cana-de-açúcar é a armadilha (“*trap*”) contendo Tenax-TA (Fig. 2.6). Contudo, essa técnica não é recomendada para compostos voláteis com baixo ponto de ebulição, pelo que o seu uso é mais indicado para compostos com mais de seis átomos de carbono (Nóbrega, 2003).

No caso dos ésteres, os compostos com mais de seis átomos de carbono considerados importantes para o aroma da aguardente de cana-de-açúcar, estão compreendidos entre o hexanoato de etilo e o dodecanoato de etilo (Nóbrega, 2003).

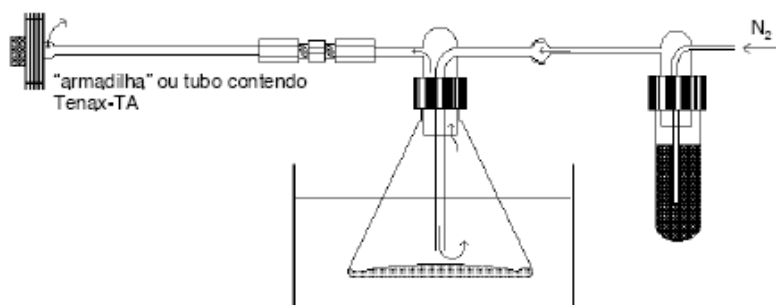


Fig. 2.6 – Concentração dinâmica do “*head-space*” da cachaça em Tenax-TA.

2.2.1.2.1.1. – Efeito da temperatura e da força iónica nas eficiências de extracção

Na extracção de compostos voláteis presentes no “*head-space*” da aguardente de cana-de-açúcar, o tempo de absorção (situação em que se atinge o equilíbrio entre a amostra e o revestimento) depende da temperatura de extracção e da força iónica da amostra (Nonato *et al.*, 2001).

Nonato *et al.* (2001) verificaram nos seus estudos de investigação (extracção por “*head-space*” SPME dos compostos voláteis da aguardente de cana-de-açúcar seguido de análise por GC-MS e GC-FID) que mantendo o tempo de desorção em 3 minutos, a temperatura de extracção em 60° C e adicionando cerca de 2,5 gramas de NaCl, que o equilíbrio entre a amostra e o revestimento era atingido após cerca de 25 minutos (correspondendo ao tempo de absorção). As pequenas variações nas áreas dos analitos nas curvas de absorção após esse período de tempo comprovaram que se tinha atingido o equilíbrio entre a amostra e o revestimento.

O efeito da força iónica na eficiência da extracção foi estudado também por Nonato *et al.* (2001) analisando soluções-padrão contendo diferentes concentrações de cloreto de sódio e mantendo o tempo de absorção e desorção em 25 minutos e 3 minutos, respectivamente. A adição de cloreto de sódio diminui a solubilidade dos compostos orgânicos solúveis na água, facilitando a extracção e concentração dos mesmos na fibra.

Nonato *et al.* (2001) verificaram que a extracção era máxima (para um *vial* de 20 mL) (Fig. 2.7) quando a quantidade de cloreto de sódio adicionado à amostra para extracção dos compostos voláteis era de 2,5 gramas.

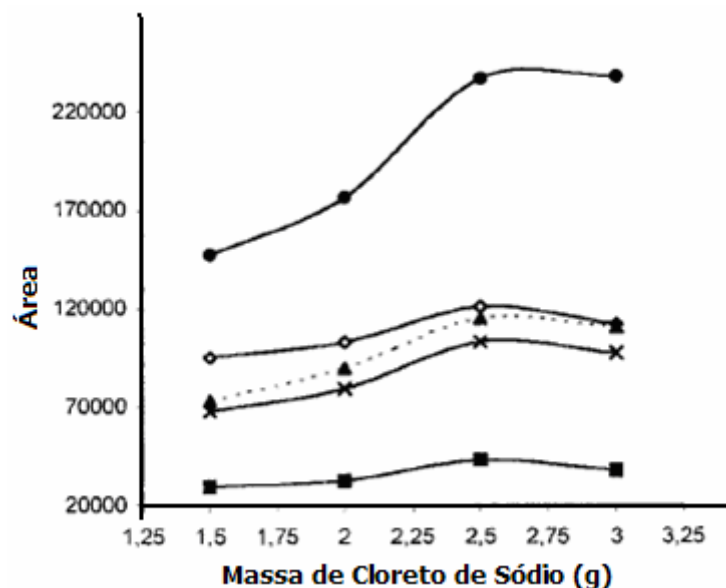


Fig. 2.7 – Efeitos das diferentes concentrações de cloreto de sódio nas eficiências de extracção de acetato de etilo (◇) e dos álcoois: 1-propil (■), isobutil (▲), 1-butil (*) e isoamílico (●).

A temperatura aumenta a concentração dos analitos no “*head-space*”. Contudo, a mesma deverá ser controlada uma vez que o processo de absorção pela fibra é exotérmico (Nonato *et al.*, 2001).

Nonato *et al.* (2001) compararam diversas temperaturas de extracção (50, 60, 70 e 80 °C) com o intuito de testar a influência dos mesmos na eficiência da concentração dos analitos por parte da fibra (Fig. 2.8), concluindo que existe apenas uma ligeira diferença quando se utiliza temperaturas de extracção de 60 ou 70 °C. Contudo, verificaram que mesmo sendo pequena a diferença, que à temperatura de 60 °C, o processo de concentração exotérmica dos analitos na fibra era mais eficiente.

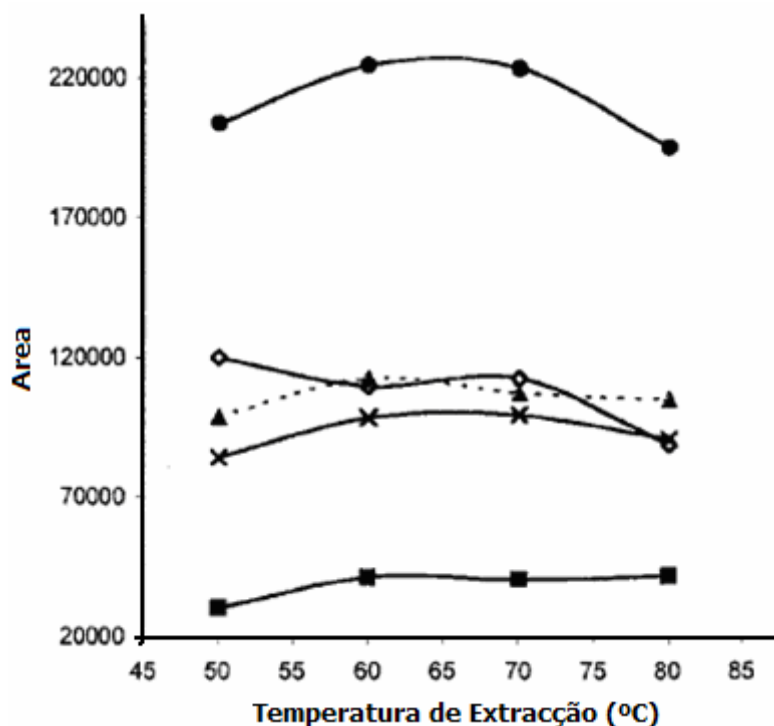


Fig. 2.8 – Efeitos das diferentes temperaturas nas eficiências de extração de acetato de etilo (◇) e dos álcoois: 1-propil (■), isobutil (▲), 1-butil (*) e isoamílico (●) .

2.3 – Análise da aguardente de cana-de-açúcar por GC-MS

De entre os poucos trabalhos realizados relativos à determinação de compostos voláteis da aguardente de cana-de-açúcar por GC-MS destacam-se os Nonato *et al.* (2001) e Nóbrega (2003).

2.3.1 – Padrão-interno para análise de compostos voláteis da aguardente de cana-de-açúcar por GC-MS

Após a preparação da amostra e antes da injeção da amostra no aparelho de GC-MS procede-se à adição do *padrão interno*. A adição do padrão interno visa a quantificação *à posteriori* dos compostos voláteis da aguardente, através da comparação da área dos picos obtidos para os compostos com a área do pico obtido para o padrão interno (Nóbrega, 2003).

A escolha do padrão interno depende dos analitos que se pretende quantificar. Uma vez que é necessário garantir que o composto que vai ser utilizado como padrão interno não existe na amostra da aguardente de cana-de-açúcar (Nóbrega, 2003). Por exemplo, Nonato *et al.* (2001) utilizaram uma solução de álcool 1-butil como padrão interno, na análise de compostos voláteis presentes no "*head-space*" da aguardente de cana-de-açúcar.

2.3.2 – Compostos voláteis maioritários detectados no "*head-space*" da aguardente da cana-de-açúcar pelas análises GC-MS

Nóbrega (2003) analisou os compostos voláteis da aguardente de cana-de-açúcar por GC-MS com coluna de sílica capilar fundida e usando o hélio como gás de arraste. O varrimento ("*scan*") efectuado conduziu à identificação de 22 compostos no "*head-space*" da aguardente.

A maioria dos compostos identificados por Nóbrega (2003), que utilizou a "*armadilha*" ("*trap*") em *Tenax-TA* [(poli(óxido de 2,6-defenil-p-fenilenol))] para extracção dos compostos voláteis da aguardente de cana-de-açúcar, pertencia ao grupo dos ésteres.

O dispositivo para a extracção com *Tenax-TA* utilizado por Nóbrega (2003) consistiu em uma armadilha, composta de um tubo (155 mm de comprimento x 3 mm de diâmetro interno) de aço inoxidável (revestida internamente com 85 mg do adsorvente *Tenax-TA*) acoplada a uma outra peça de aço inoxidável, que por sua vez, se encontra conectado a uma tampa (acoplada a um dispositivo de vidro).

De entre os ésteres identificados por Nóbrega (2003) no seu estudo, destacam-se o propanoato de etilo, o butanoato de etilo, o acetato de 3-metilbutilo, o pentanoato de etilo e o hexanoato de etilo. Entretanto, foram identificados alguns outros compostos como os acetais 1,1-dietoxi-etano e 1-etoxi-1-pentoxi-etano, o álcool terciário 3-metil-1-butanol (álcool isoamílico) e o composto sulfurado 4,5,-de-hidro-2-metil-3(2H)-tiofenona.

Todavia, o número de compostos detectados por Nóbrega (2003) estará em defeito. Isto, porque a técnica de preparação utilizada pelo mesmo, a "*armadilha*" ("*trap*") em *Tenax-TA*, conduz à perda de compostos com um número reduzido de carbonos, como o acetato de etilo e o ácido acético. A perda estará relacionada com o facto de

esses compostos terem um tempo de retenção na armadilha inferior ao tempo de extracção total necessário para a "armadilha".

A Fig. 2.9 mostra os compostos identificados por Nóbrega (2003) no "head-space" da aguardente de cana-de-açúcar, utilizando a "armadilha" em *Tenax-TA*.

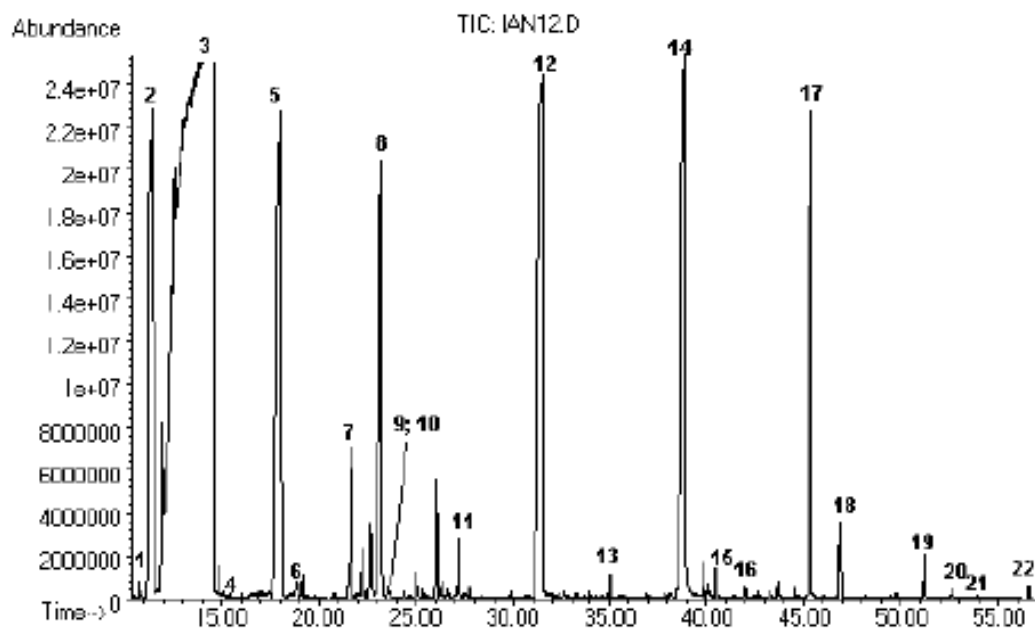


Fig. 2.9 – Cromatograma iónico total do "head-space" da aguardente de cana-de-açúcar obtido por Nóbrega (2003).

Legenda:

<u>Ésteres</u>		<u>Outros Compostos</u>
01 - Propanoato de etilo	15 - Octanoato de 3-metilbutilo	02 - 1,1-dietoxi-etano
04 - Butanoato de etilo	16 - Undecanoato de etilo	03 - 3-Metil-1-butanol
05 - Acetato de 3-metilbutila	17 - Dodecanoato de etilo	07 - 1-etoxi-1-pentoxi-etano
06 - Pentanoato de etilo	18 - Decanoato de 3-metilbutilo	09 - 4,5-De-hidro-2-metil-3(2H)-tiofenona
08 - Hexanoato de etilo	19 - Tetradecanoato de etilo	
10 - Acetato de hexilo	20 - Dodecanoato de 3-metilbutilo	
11 - Heptanoato de etilo	21 - Pentadecanoato de etilo	
12 - Octanoato de etilo	22 - Hexadecanoato de etilo	
13 - Nonanoato de etilo		
14 - Decanoato de etilo		
15 - Octanoato de 3-metilbutila		

Nonato *et al.* (2001) utilizando a SPME como método de extração dos compostos voláteis da aguardente de cana-de-açúcar conseguiram identificar (Fig. 2.10) por GC-FID uma gama maior de compostos voláteis, incluindo o acetato de etilo e o ácido acético.

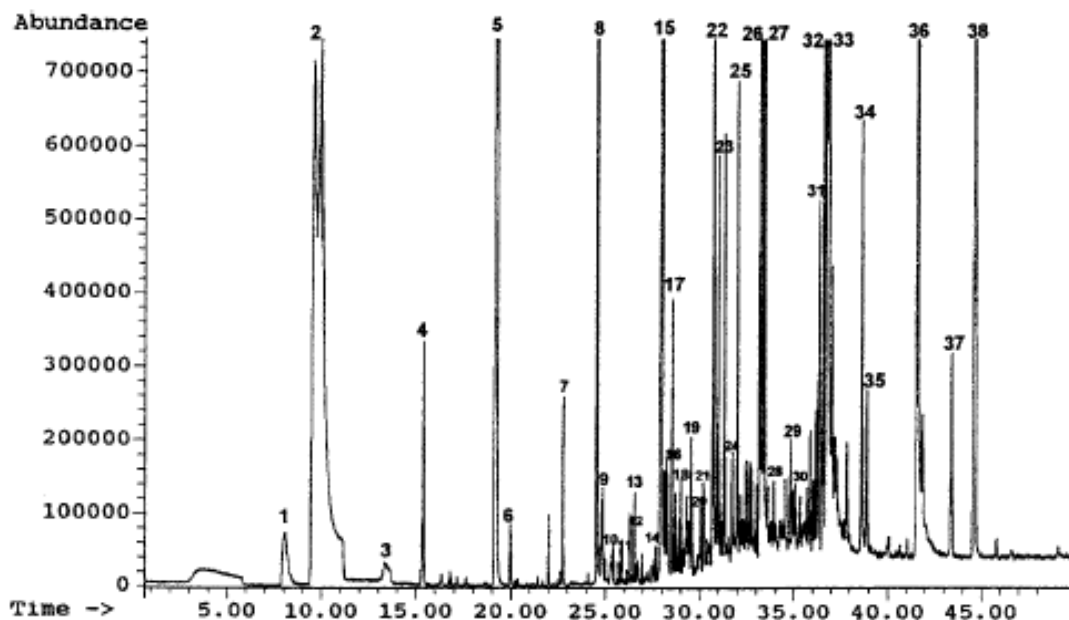


Fig. 2.10 – Compostos identificados por Nonato *et al.* (2001) por GC-FID no “Head-space” da aguardente de cana-de-açúcar.

Legenda:

- | | |
|---|--|
| 1 – Acetato de etilo | 19 – 1- Decanol |
| 2 – Álcool etílico | 20 – β -citronelol |
| 3 – Álcool 1-propílico | 21 – Ciclodeceno |
| 4 – Álcool isobutílico | 22 – Dodecanoato de etilo |
| 5 – Álcool isoamílico | 23 – Decanoato de 3-metilbutilo |
| 6 – Hexanoato de etilo | 24 – 2,6-bis-(1,1,-dimetil-etil)-4-metil-fenol |
| 7 – Ethyl 2-hydroxy-propanoate | 25 – Álcool feniletilico |
| 8 – Octanoato de etilo | 26 – Nerolidol |
| 9 – Ácido acético | 27 – Ácido octanoico |
| 10 – 2-etil-1-hexanol | 28 – 2,6 – Dimetil-naftaleno |
| 11 – Hexylmethylcarbinol | 29 – Pentadecanoato de etilo |
| 12 – Ethyl 2-hidroxy-4-methylpentanoate | 30 – Ciclododecano |
| 13 – Álcool caprílico | 31 – α -bisabolol |
| 14 – 4-methyl-1-(1-methylethyl)-3-cyclohexen-1-ol | 32 – Hexadecanoato de etilo |
| 15 – Decanoato de etilo | 33 – Ácido decanoico |
| 16 – β -farnesene | 34 – Cis-famesol |
| 17 – Dietil-butanoato | 35 – Ciclotetradecano |
| 18 – α,α , 4-trimetil-3-ciclohexeno-1-metanol | 36 – Ácido dodecanoico |
| | 37 – Linoleato de etilo |
| | 38 – Bis-2-methyl propylate-1,2-benzenedicarboxylate |

Cardoso *et al.* (2003) utilizando a extracção *líquido-líquido* como método de extracção de compostos voláteis da aguardente de cana-de-açúcar (nomeadamente cetonas) para a análise por GC-FID conseguiram identificar alguns compostos voláteis (Fig. 2.11) como a acetona, a acetofenona e o ciclopentanona.

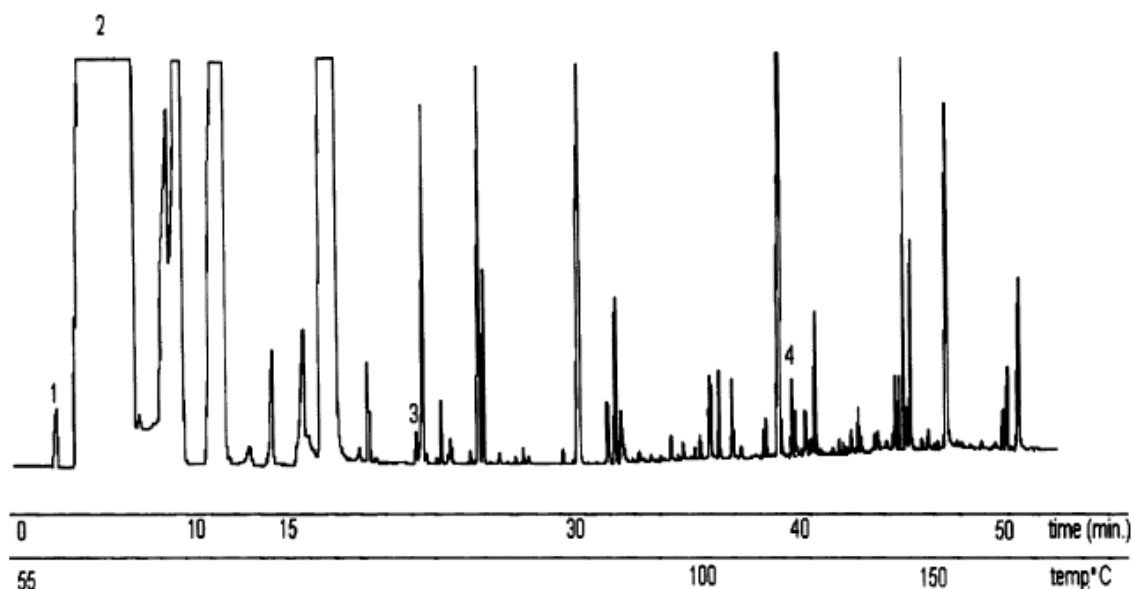


Fig. 2.11 – Cromatograma parcial da aguardente de cana-de-açúcar analisada por GC-FID usando uma coluna capilar *HP-FAP*.

Legenda: 1 – acetona; 2 – etanol; 3 – ciclopentanona; 4 – acetofenona.

Os ésteres mais abundantes presentes nas bebidas destiladas tendem a ser os derivados dos ácidos voláteis e de álcoois mais abundantes (Nóbrega, 2001).

Nascimento *et al.* (2000) constataram que de entre os ácidos voláteis em maior expressão na aguardente de cana-de-açúcar encontram-se, o ácido acético, o ácido octanóico, o ácido decanóico e o ácido dodecanóico.

Em relação aos álcoois terciários (álcoois alifáticos e aromáticos) que se formam a partir de aminoácidos por transaminação, descarboxilação e processos de redução, Nonato *et al.* (2001) conseguiram identificar os álcoois isoamílico (3-metil-1-butanol), isobutílico e propílico em diversas aguardentes de cana-de-açúcar.

Capítulo 3

Aplicação da análise multivariada para classificação de aguardente de cana-de-açúcar e outras bebidas alcoólicas

3.1 – A análise multivariada

A utilização de técnicas de análises multivariada para caracterização de diversos produtos alimentares, como os vinhos e outras bebidas alcoólicas, tem vindo a ser alvo de uma maior atenção recentemente. A conjugação da análise multivariada com a análise instrumental demonstrou ser capaz de classificar, por exemplo, vinhos de diferentes regiões identificando em relação aos mesmos, características similares e discriminantes (Arvanitoyannis *et al.*, 1999).

3.1.1. – Técnicas de reconhecimento de padrões (com e sem supervisão)

Os procedimentos de classificação quimiométrica são muito utilizados para classificação de produtos de origens certificadas. Na Quimiometria, os métodos de reconhecimento de padrões são especialmente úteis para a classificação de um determinado número de indivíduos ou objectos em classes discretas tendo como base parâmetros medidos ou variáveis (Gómez *et al.*, 2004).

Os métodos de reconhecimento de padrões podem ser divididos em métodos de reconhecimento de padrões com e sem supervisão. Os métodos de reconhecimento de padrões com supervisão englobam os métodos como a análise discriminante linear, *LDA* (do inglês, *Linear Discriminant Analysis*), o *KNN* (do inglês, *K Nearest-Neighbor*) que baseia-se na comparação da distância (distância Euclidiana) ou o *SIMCA* (do inglês, *Soft Independent Modeling of Class Analogies*). Esses métodos são usados quando as classes ou grupos são conhecidos e o objectivo é encontrar regras que permitam decidir em qual das classes ou grupos deve-se colocar uma determinada amostra que se encontra sob investigação (Gómez *et al.*, 2004; Fernandes *et al.*, 2005).

Nos métodos de reconhecimento de padrões sem supervisão (técnicas de agrupamento) englobam-se aqueles em que a classificação natural de objectos caracterizados por um determinado número de variáveis não é conhecida e em que, o objectivo é definir grupos similares de objectos, ou seja, são chamados classificados como “*sem supervisão*” porque são usados para explorar dados (dados referentes a amostras, em que à partida não se sabe nada sobre os grupos, nomeadamente números de grupos existentes, nem do número de elementos que constituem cada um dos grupos). Como exemplo dos métodos de reconhecimento de padrões sem supervisão tem-se a Análise em Componentes Principais e a Análise de Grupos Hierárquica (Gómez *et al.*, 2004; Fernandes *et al.*, 2005).

Os métodos de reconhecimento de padrões podem ser classificados ainda em paramétricos e não paramétricos. No grupo dos métodos paramétricos inclui-se, por exemplo o método LDA. Neste método, os parâmetros estatísticos para a distribuição das amostras são usadas na derivação de uma função discriminante (Gómez *et al.*, 2004).

Para uma utilização apropriada dos métodos paramétricos, tem-se sempre em conta duas suposições: a primeira, que os dados seguem uma distribuição normal e a segunda, que a variância das classes é igual, ou seja, por outras palavras, que as classes têm uma dispersão igual de dados em todas as variáveis (Gómez *et al.*, 2004).

Os métodos não paramétricos, como por exemplo as árvores de classificação e regressão, *CRT* (do inglês, *Classification and Regression Trees*), não se baseiam explicitamente na distribuição estatística. As árvores de classificação incluem os modelos em que as variáveis são categóricas enquanto que as árvores de regressão incluem os modelos em que as variáveis são contínuas (Gómez *et al.*, 2004).

3.1.1.1 - Análise em Componentes Principais, *PCA* (do inglês, “*Prouncupal Components Analysis”)*

A Análise em Componentes Principais (PCA) (ideia concebida por *Hotelling*) é uma técnica de análise multivariada que reduz a dimensão da matriz de dados original, retendo contudo a quantidade máxima de variabilidade, permitindo assim a visualização de dados (correspondentes às amostras em estudo) num espaço a duas dimensões, identificando as direcções em que a maioria da informação é retida (Câmara *et al.*, 2006; Fleck *et al.*, 1998).

Por outras palavras, a PCA transforma linearmente um conjunto original de variáveis num conjunto substancialmente menor de variáveis não correlacionadas entre si e que contém a maior parte da informação do conjunto original (Fleck *et al.*, 1998).

Os componentes principais descrevem, por ordem decrescente, a maior parte da variação entre objectos e são calculados de forma que sejam ortogonais entre si. Por isso, cada componente principal pode ser interpretado independentemente. Este facto permite uma visão geral da estrutura dos dados nomeadamente, eventuais relacionamentos entre objectos e detecção de objectos anómalos (Nieuwoudt *et al.*, 2004).

Para encontrar as fontes de variação, a matriz de dados original definida por $X(n, m)$ é decomposta num espaço de objecto, espaço de variável, e matriz de erro. A matriz de erro representa a variação não explicada pelos componentes principais extraídos. O algoritmo que descreve esta decomposição é representada por (Nieuwoudt *et al.*, 2004):

$$X(n, m) = T(n, k)P(k, m)^T + E(n, m)$$

Onde,

X , é a matriz de variáveis independentes;

T , é a matriz de *scores*;

P , é a matriz de pesos (*loadings*);

E , é a matriz de erro;

n , é o número de objectos;

m , é o número de variáveis;

k , é o número de componentes principais usado.

A Análise em Componentes Principais permite assim extrair informação útil a partir dos dados, explorar a estrutura dos mesmos, a relação entre os objectos, a relação entre objectos e variáveis, e a correlação global das variáveis (Buratti *et al.*, 2004).

Torna-se, portanto, possível explicar através da Análise em Componentes Principais, diferenças entre vários produtos e ao mesmo tempo determinar quais as variáveis que contribuem mais para essas diferenças (Câmara *et al.*, 2006).

Os componentes principais são os vectores característicos de uma matriz de covariância, quando a Análise em Componentes Principais é realizada numa matriz normalizada. A normalização é necessária porque a Análise em Componentes Principais de

uma matriz de covariância não é apropriada quando as variáveis são medidas em unidades não comparáveis, uma vez que, os componentes principais não são invariáveis à escala (Seong *et al.*, 2006; Delgado *et al.* 2002).

Sendo assim, quando as escalas de medições utilizadas são diferentes torna-se necessário proceder preliminarmente à normalização. Diferentes formas de normalização são descritas por Milligan *et al.* (1988) e Schaffer *et al.* (1996).

Uma das formas de normalização mais utilizadas dos dados é o “*auto-escalamento*” (do inglês, “*auto scaling*”). No *auto-escalamento*, o resultado é uma variável com média zero e desvio padrão unitário (Delgado *et al.*, 2002)

Uma das vantagens do *auto-escalamento* é que a matriz da covariância que se obtém posteriormente é igual à matriz de correlação (Delgado *et al.* 2002).

3.1.1.1.1 – Critérios para determinação do número de componentes principais a reter numa determinada análise

Um dos principais problemas na Análise em Componentes Principais prende-se com o critério de escolha do número de componentes principais a ter em consideração numa determinada análise (Fleck *et al.*, 1998).

Existem vários critérios que permitem determinar o número de componentes principais que devem ser tidos em consideração (Fleck *et al.*, 1998):

- a) Critério de Kaiser;*
- b) Critério baseado no diagrama de vectores próprios;*
- c) Critério baseado nos factores interpretáveis;*
- d) Método de Simulação de Lébart.*

a) Critério de Kaiser

O Critério de Kaiser é o mais amplamente utilizado e tem como princípio considerar que os valores próprios superiores a um são os mais estatisticamente significativos (Fleck *et al.*, 1998).

Contudo, a utilização desse critério pode em certos casos, não ser o procedimento mais correcto. Isto porque, nem todos os valores próprios superiores a um correspondem a componentes com significado evidente (Fleck *et al.*, 1998).

b) Critério baseado no diagrama de vectores próprios

A análise do diagrama de valores próprios permite reter os valores que se situam acima do ponto de ruptura da queda da curva de função que relaciona a ordem e os valores próprios. Assim sendo, se dois componentes estão associados a valores próprios quase iguais, quer dizer que os mesmos representam quase a mesma proporção de variabilidade, não se justificando, *a priori*, a retenção de um e não do outro. Mas, inversamente, uma diminuição brusca entre os dois valores próprios sucessivos leva à retenção (na interpretação) dos componentes que precederam essa diminuição (Fleck *et al.*, 1998).

c) Critério baseado nos factores interpretáveis

Este critério, embora empírico (mas, com algum sentido), é recomendado por diversos autores. A sua utilização propõe reter os componentes que claramente têm significado (Fleck *et al.*, 1998).

d) Método de simulação de Lébart

O método de simulação de Lébart tem conta as situações em que a Análise em Componentes Principais é realizada com um conjunto de dados que na sua construção não continham qualquer estrutura subjacente (Fleck *et al.*, 1998).

Para aplicação do método de simulação de Lébart, cria-se primeiramente uma matriz de números aleatórios (que respeitem a mesma distribuição e a mesma média de cada variável em estudo). Seguidamente, faz-se a Análise em Componentes Principais, obtendo-se os valores próprios (Fleck *et al.*, 1998).

Este processo referido acima é repetido "*n*" vezes, retendo-se sempre cada valor próprio máximo obtido em cada uma das "*n*" simulações. Esses valores máximos, por sua vez, representam o limite inferior que deve ser ultrapassado para que um determinado componente possa ser levado em conta (Fleck *et al.*, 1998).

A probabilidade de um valor próprio ser maior que o valor máximo obtido durante as $(n - 1)$ simulações efectuadas é de $(1/n)$, ou seja, por outros termos, há um risco de $(1/n)$ de um determinado valor próprio de uma determinada matriz ser superior a este limite de confiança (Fleck *et al.*, 1998).

3.1.1.2 – Análise em Componentes Principais vs Análise de Grupos (Análise de *Clusters* ou "*Clusters Analysis*")

Frequentemente, faz-se uma distinção entre a Análise de Grupos e a Análise em Componentes Principais. A Análise de Grupos está relacionada com a classificação de indivíduos, enquanto que a Análise em Componentes Principais tem em conta relacionamentos entre variáveis (Seong *et al.*, 2006).

Quando se está perante um grande número de variáveis, geralmente é recomendável utilizar os componentes principais com valores próprios elevados para reduzir o número de variáveis, antes de utilizar a Análise de Grupos (Seong *et al.*, 2006).

A recomendação não é genérica, uma vez que em certos casos, pode ser necessário efectuar primeiramente a Análise de Grupos (no sentido de se detectar alguma tendência de agrupamento natural) e seguidamente a Análise em Componentes Principais para visualizar a estrutura dos dados (Fernandes *et al.*, 2005).

3.1.1.3. – Análise em Componentes Principais vs Análise Factorial

O objectivo da Análise em Componentes Principais é em certa medida semelhante ao da Análise Factorial. Ambas as técnicas tentam explicar parte da variação de um conjunto de variáveis, a partir de um menor número de variáveis subjacentes (Fleck *et al.*, 1998).

No entanto, a Análise em Componentes Principais e a Análise Factorial diferenciam-se principalmente no facto de que quando se efectua a Análise em Componentes Principais, não se parte de nenhum modelo estatístico (ou seja, não existe nenhum modelo estatístico prévio), enquanto que a análise factorial, tem em conta um modelo estatístico prévio que divide a variância total (Fleck *et al.*, 1998).

3.1.1.3 – *Softwares* de análise multivariada

Existem no mercado vários *softwares* muito úteis de análise multivariada. De entre alguns exemplos, destacam-se o *SPSS*TM (SPSS, Inc.), o *MatLab*TM (Mathworks, Inc.) o *Unscrambler*TM (CAMO Process AS), o *Statistica*TM e o *Minitab*TM (Fernandes *et al.*, 2005; Lachenmeier *et al.*, 2005; Kallithraka *et al.* 2001).

3.1.2 – Aplicação de métodos quimiométricos para caracterização de bebidas alcoólicas

As técnicas de análise multivariada como a Análise em Componentes Principais e Análise de Grupos têm vindo a ser utilizadas para caracterização e diferenciação de diversas bebidas alcoólicas como os vinhos, por exemplo. Encontram-se referenciados vários trabalhos publicados como os de Burati *et al.* (2004) e Câmara *et al.* (2006) relativos à utilização da Análise em Componentes Principais para classificar e diferenciar vinhos de diversas origens.

Por exemplo, Câmara *et al.* (2006) utilizaram a Análise em Componentes Principais para classificar e diferenciar diferentes vinhos da Madeira tendo em conta a constituição dos mesmos relativamente aos compostos voláteis (que por sua vez, é influenciada pelo tipo de uva utilizado na fermentação).

A utilização da Análise em Componentes Principais (Fig. 3.1) permitiu a determinação das principais fontes de variabilidade presentes nos dados e estabelecer relação entre as amostras de vinhos (objectos) e compostos voláteis (variáveis), mostrando uma clara separação dos quatros tipos de vinhos, tendo como variáveis, os teores em relação a álcoois terciários, ácidos gordos, ésteres etílicos e compostos carbonílicos (Câmara *et al.*, 2006).

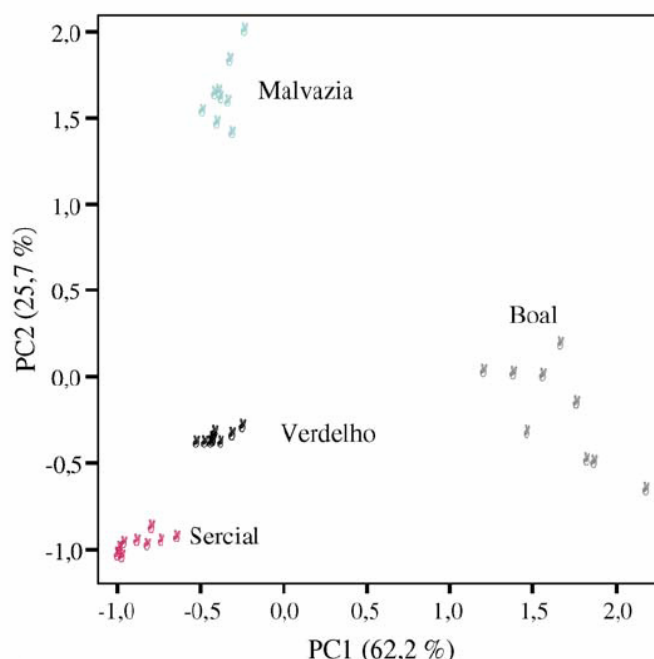


Fig. 3.1 – Análise em Componentes Principais para as amostras de vinho da Madeira efectuada por Câmara *et al.* (2006).

Burati *et al.* (2004) analisaram 53 amostras diferentes de vinhos procedentes de duas regiões nortenhas italianas. Para cada amostra foi realizado uma análise físico-química englobando vários parâmetros como a acidez, o pH, a condutividade, o teor de álcool, o extracto total, o potencial de oxidação-redução, o teor total de fenóis e a absorvância a 4 comprimentos de onda diferentes (280, 320, 370 e 520 nm). Outros parâmetros, para além dos mencionados como, por exemplo, a composição em relação aos compostos voláteis foram também avaliados usando o *nariz electrónico*.

A Análise em Componentes Principais da matriz de dados (53 linhas (amostras de vinhos) e 28 colunas (variáveis) mostrou que os quatro primeiros componentes principais representavam 69 % da variância total. Para além disso, a examinação do *score plot* (Fig 3.2) na área definida pelos dois primeiros componentes principais (que representavam 51,7 % da variância total) mostraram uma clara separação das amostras de acordo com a região de origem (Burati *et al.*, 2004).

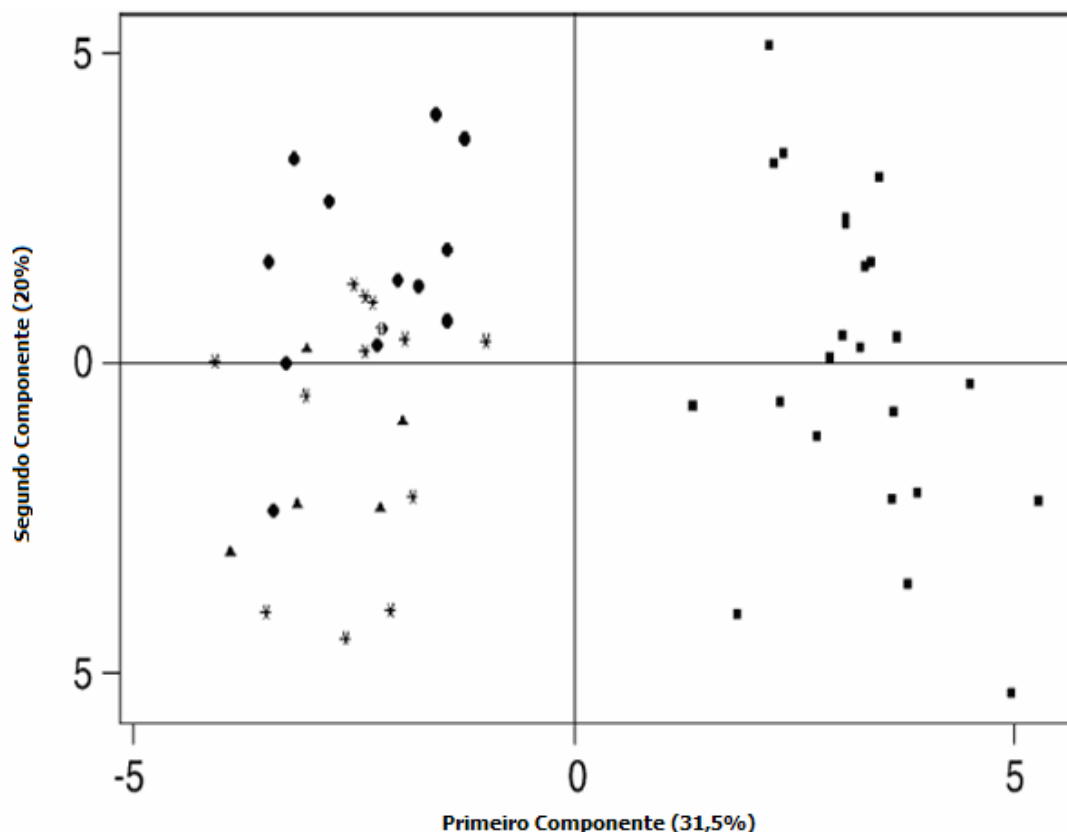


Fig. 3.2 – *Score plot* de amostras de vinhos no plano definido pelos dois primeiros componentes principais. (■) Barbera Oltrepó Pavese; (●) Barbera Piemonte; (*) Barbera Asti; (▲) Barbera Alba.

Além dos vinhos, estão também referenciados alguns trabalhos sobre a utilização da Análise em Componentes Principais visando a diferenciação de bebidas espirituosas.

Lachenmeier *et al.* (2005) analisaram diferentes tequilas (umas autênticas e outras produzidas no estrangeiro) por Espectroscopia de Infravermelho de Transformada de Fourier (FTIR, do inglês *Fourier Transform Infrared*) e Cromatografia Iónica, utilizando de seguida a Análise em Componentes Principais para classificar e diferenciar as mesmas.

A Análise em Componentes Principais (Fig. 3.3) mostrou que os dois primeiros componentes principais da Análise em Componentes Principais realizada tendo em conta os valores das concentrações dos aníões pesquisados eram responsáveis por 78 % da variabilidade, permitindo, certa medida a diferenciação entre tequilas produzidas no México e no Estrangeiro (Lachenmeier *et al.*, 2005).

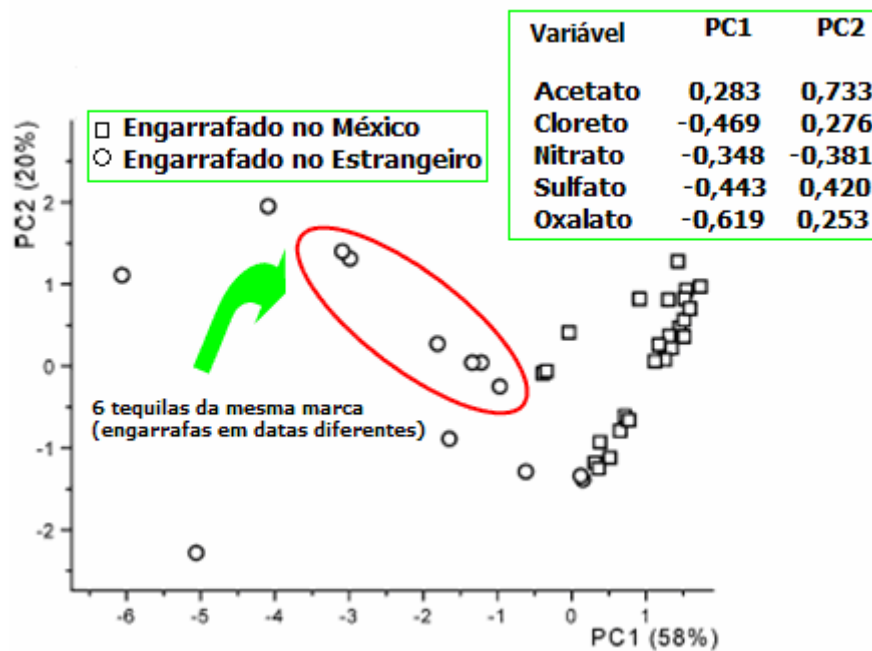


Fig. 3.3 – Representação gráfica de PC1 vs PC2 para as concentrações de aniões acetato, cloreto, nitrato, sulfato e oxalato em tequilas estudadas por Lachenmeier *et al.*, 2005.

Os mesmos autores determinaram a concentração de alguns compostos voláteis presentes nas tequilas, tendo aplicado de seguida a Análise em Componentes Principais aos resultados. A Análise em Componentes Principais efectuada (Fig. 3.4) permitiu a diferenciação de tequilas autênticas de "tequilas" produzidas no estrangeiro.

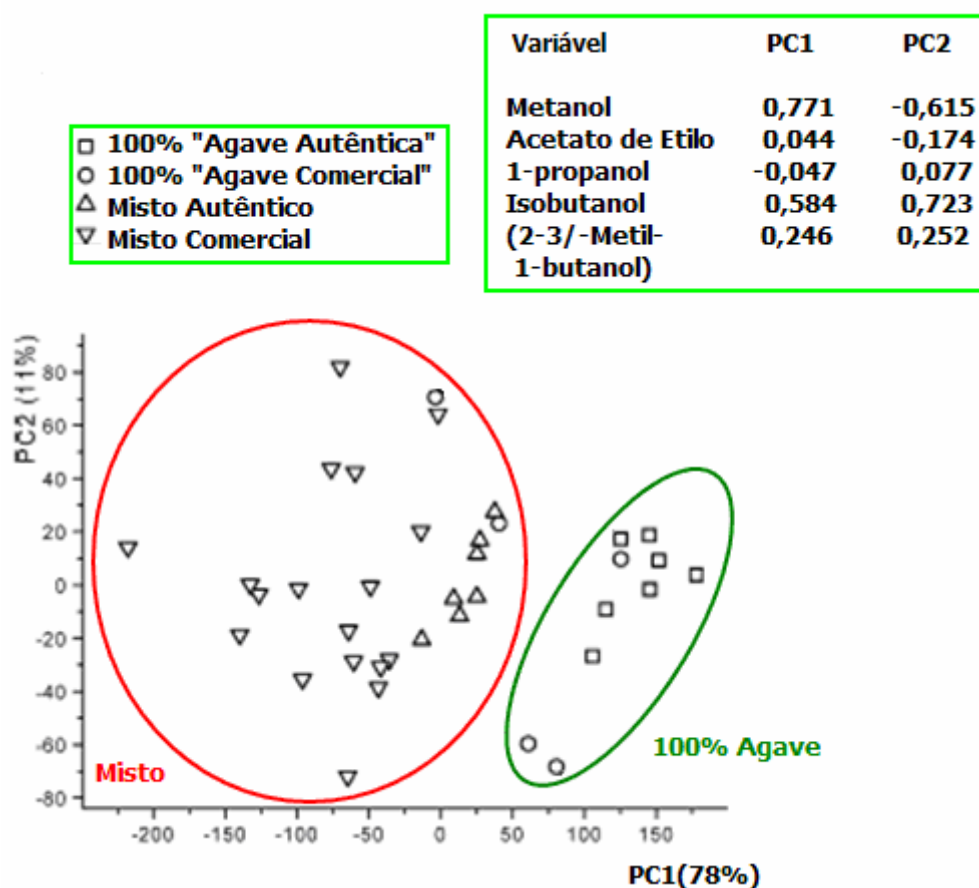


Fig. 3.4 - Representação gráfica de PC1 vs PC2 para os compostos voláteis presentes nas tequilas (metanol, acetato de etilo, 1-propanol, isobutanol e 2-3-metil-1-butanol, determinados em 38 amostras de tequila usando a espectroscopia de FTIR).

De forma semelhante a Lachenmeier *et al.* (2005), Fernandes *et al.* (2005) utilizaram técnicas de reconhecimento de padrão (Análise em Componentes Principais, Análise de Grupos hierárquica e *KNN*) para diferenciar cachaças e cafés de diversas origens tendo em conta as concentrações de vários iões metálicos determinados por *ICP-OES* (do inglês, *Inductively Plasma – Optical Emission Spectrometry*).

A Análise em Componentes Principais (Fig. 3.5) efectuada para as amostras de cachaça demonstrou uma homogeneidade das amostras no que concerne à origem geográfica, mas permitiu uma diferenciação (embora não muito evidente) entre aguardentes de cana-de-açúcar caseiras e industrializadas.

As mesmas técnicas demonstraram que os elementos Ca, Mg, K, Cu, e Pb eram os que melhor descreviam as cachaças caseiras, enquanto que o Na e o Si eram os que melhor descreviam as cachaças industrializadas (Fernandes *et al.*, 2005).

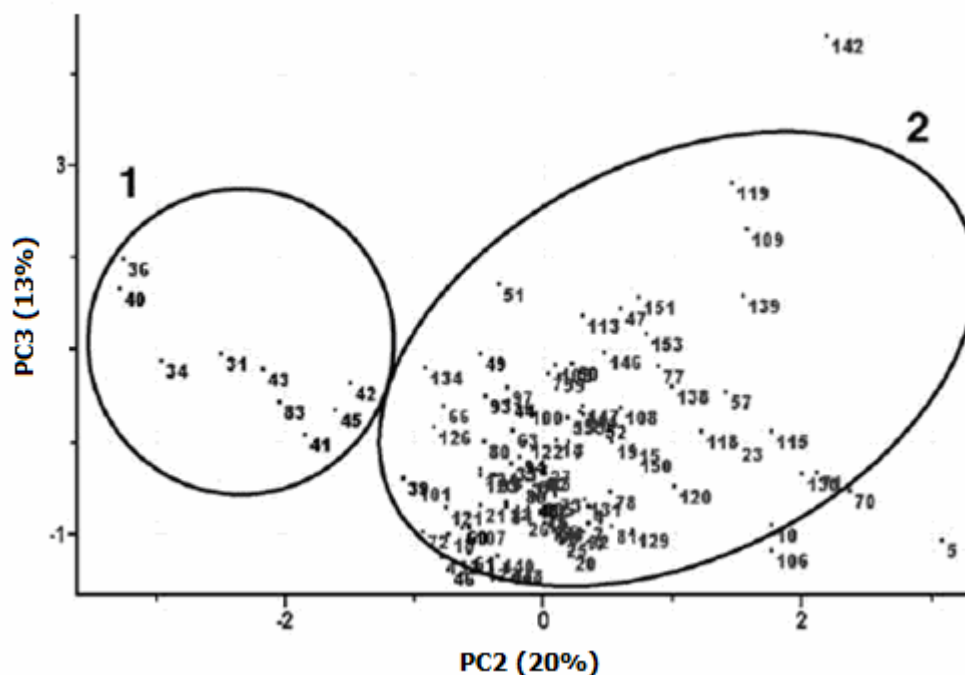


Fig. 3.5 – Análise em Componentes Principais para as amostras de cachaça.

Legenda: 1 – Cachaças industriais; 2 – Cachaças caseiras.

Após a realização da Análise em Componentes Principais, Fernandes *et al.* (2005) utilizaram a Análise Hierárquica de Grupos (Fig. 3.6) para verificar se os resultados da Análise em Componentes Principais (que indicavam a homogeneidade das amostras no que concerne à região geográfica) eram plausíveis.

A Análise de Grupos realizada (Análise de Grupos Hierárquica) demonstrou a presença de dois grupos (A e B) sem uma nítida separação com índice de similaridade à volta de 0,2 e 0,3 (corroborando os resultados da Análise em Componentes Principais).

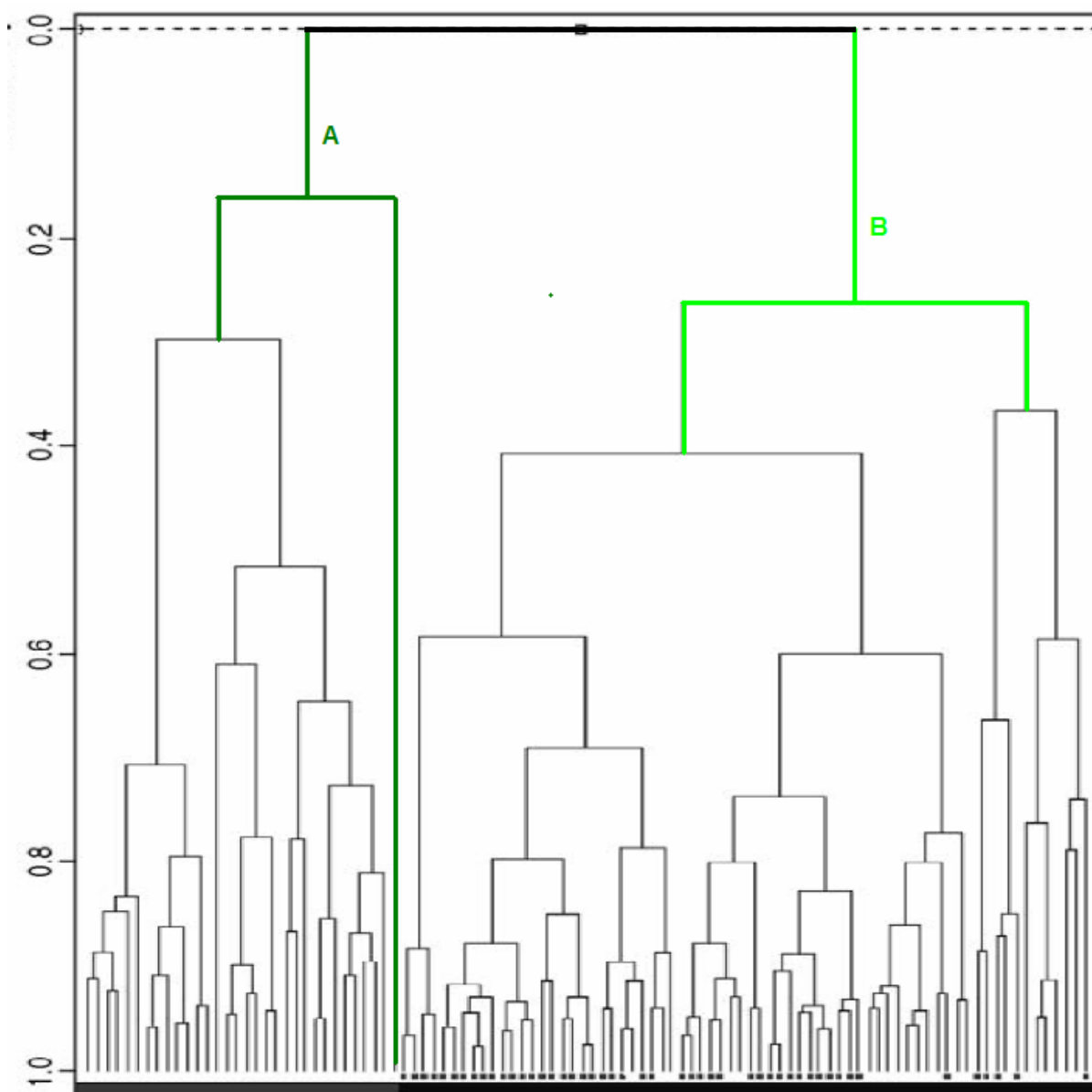


Fig. 3.6 – Análise de Grupos efectuada para as amostras de cachaça por Fernandes *et al.* (2005).

Kallithraka *et al.* (2001) aplicaram a Análise em Componentes Principais a dados obtidos por análise instrumental e sensorial de vinhos gregos. A Análise em Componentes Principais efectuada tendo em conta os teores de antocianinas e análise sensorial (Fig. 3.7) permitiu a diferenciação (embora não muito evidente) dos vinhos tintos gregos de acordo com a origem geográfica.

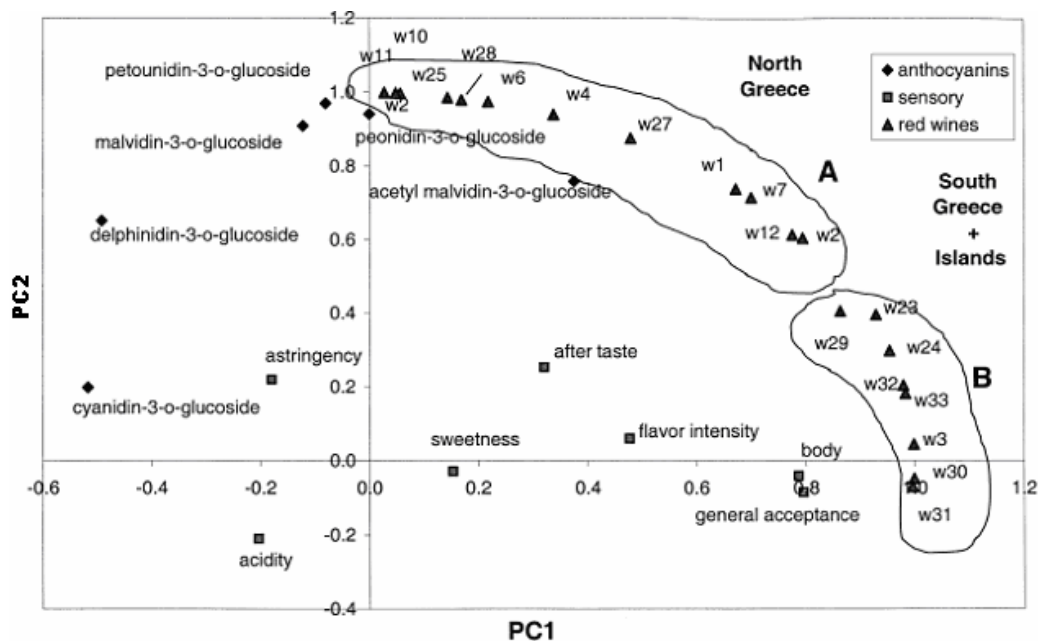


Fig. 3.7 – Análise em Componentes Principais dos dados correspondentes a teores de antocianinas e análise sensorial de vinhos tintos gregos.

A Análise em Componentes Principais realizada pelos mesmos autores para os vinhos brancos (Fig. 3.8) tendo conta os teores de miricetina, ácido gálico, ácido p-coumarico e Zn^{2+} , não permitiu, contudo, qualquer diferenciação dos mesmos quanto à região geográfica.

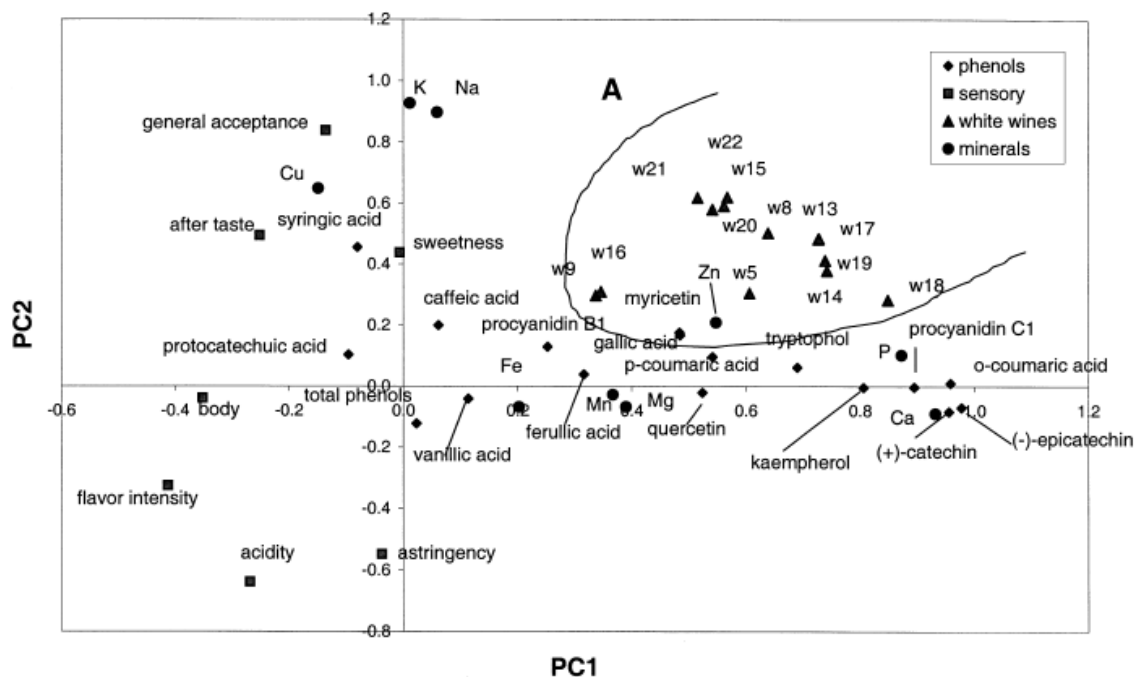


Fig. 3.8 – Análise em Componentes Principais dos dados correspondentes a teores de miricetina, ácido gálico, ácido p-coumarico (fenol) e Zn^{2+} (mineral).

Cardello *et al.* (1998) utilizaram a Análise em Componentes Principais para estudar a influência do envelhecimento em tonel de carvalho nas características sensoriais da cana-de-açúcar como o aroma por exemplo. Esses investigadores analisaram amostras de aguardente de cana-de-açúcar envelhecidas durante 0, 12, 24, 36 e 48 meses em um tonel de carvalho de 200 litros e duas amostras comerciais, sendo que uma destas últimas era envelhecida.

A Análise em Componentes Principais realizada (Fig. 3.9) pelos mesmos investigadores com a posterior retenção dos dois componentes principais (PC1 e PC2) que no seu conjunto explicavam a maior parte da variabilidade total (97,23%) permitiu concluir que as amostras apresentavam características sensoriais marcadamente diferentes entre si.

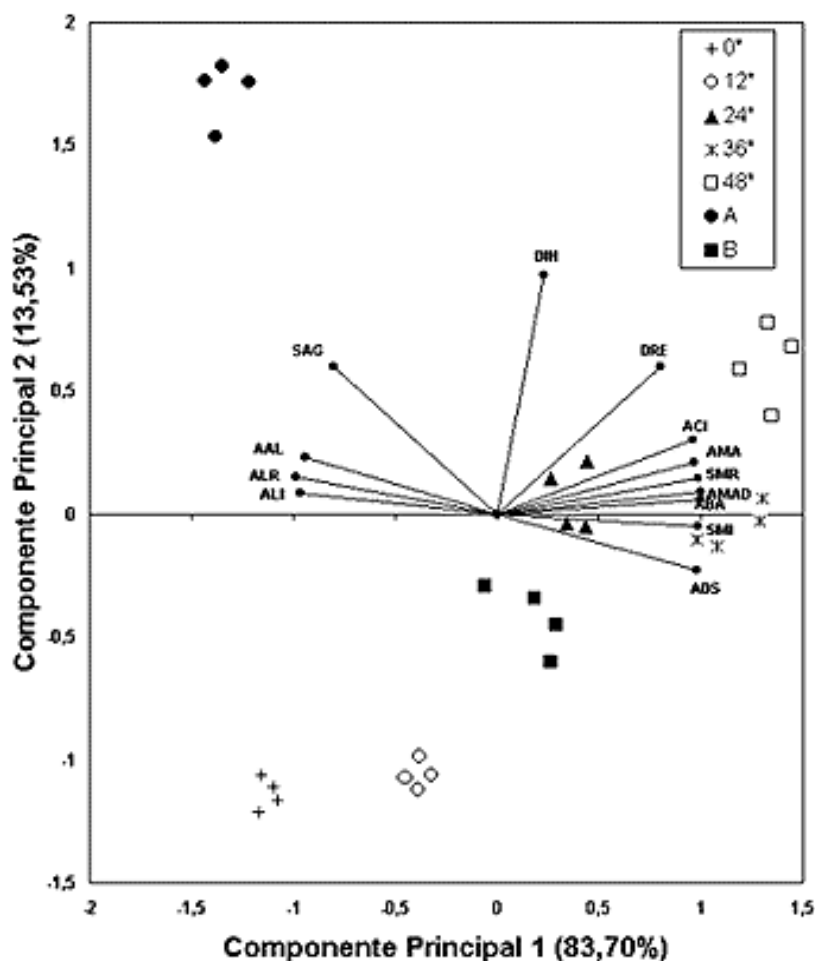


Fig. 3.9 – Figura bidimensional da Análise em Componentes Principais das aguardentes envelhecidas e comerciais. Tempo de envelhecimento em meses. A = amostra comercializada recém-destilada; B = amostra comercializada envelhecida.

Lachenmeier (2006) utilizou a Análise em Componentes Principais para estudar dados obtidos por *Espectrometria de Infravermelho de Transformada de Fourier* que visavam o desenvolvimento de uma técnica rápida para o controlo da qualidade da cerveja e bebidas espirituosas.

A conjugação da análise multivariada, neste caso, a Análise em Componentes Principais, com a análise instrumental (neste caso, a Espectrometria de Infravermelho de Transformada de Fourier) revelou-se frutífera (Fig. 3.10), tendo sido possível as diferenciar bebidas espirituosas de menor qualidade (em que a fermentação foi feita com frutas deterioradas, por exemplo) de outras bebidas espirituosas, com base nos seus teores de metanol, acetato de etilo, 1-propanol, isobutanol e 2-/3-metil-butanol.

Os dois componentes principais retidos (PC1 e PC2) explicavam a maior da variabilidade total dos dados (94 %) (Lachenmeier, 2006).

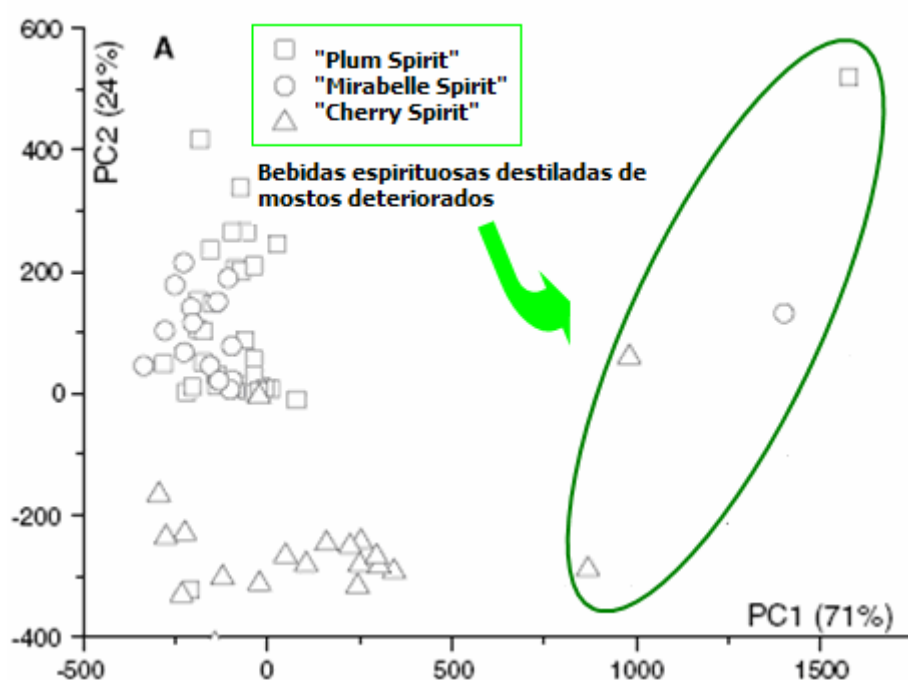


Fig. 3.10 - Análise em Componentes Principais realizada para as amostras de bebidas espirituosas.

Em relação à cerveja, a mesma conjugação de técnicas feita pelo mesmo autor permitiu a diferenciação (Fig. 3.11) de várias cervejas. Tal como no caso das bebidas

espirituosas, a Análise em Componentes Principais, permitiu detectar algumas amostras anómalas, que provavelmente eram amostras deterioradas, com elevado número de bactérias.

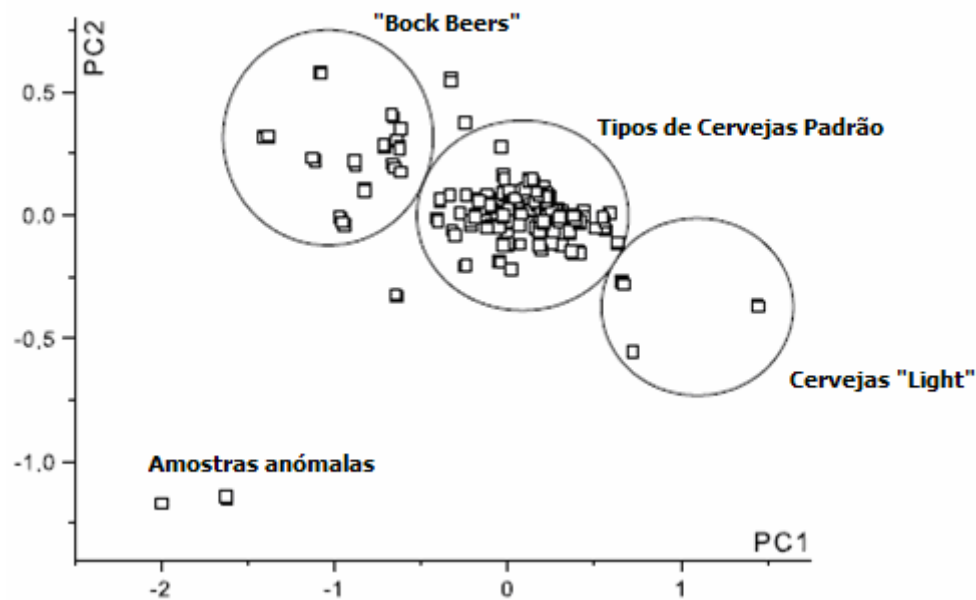


Fig. 3.11 - Análise em Componentes Principais realizada para as amostras de cervejas por Lachenmeier (2006).

Capítulo 4

Material e Métodos

4.1 – Amostras

Para o presente estudo, utilizou-se 16 amostras de aguardente de cana-de-açúcar sendo, 9 amostras de aguardente de cana-de-açúcar de Cabo Verde (produzidas por agricultores das ilhas de Santiago e Santo Antão) e 7 amostras de aguardente de cana-de-açúcar brasileira (“cachaça”) de várias marcas. As amostras de aguardente de cana-de-açúcar de Cabo Verde foram trazidas de Cabo Verde enquanto que as amostras de cachaça foram adquiridas em estabelecimentos comerciais do Distrito de Porto.

Todas as amostras após recepção ou aquisição foram armazenadas no frigorífico a 3º C no sentido de se minimizar eventuais perdas de compostos voláteis.

4.1.1 – Preparação dos padrões para a curva de calibração

Para preparação dos padrões dos cinco compostos em estudo que se pretendia quantificar (álcool isoamílico, hexanoato de etilo, octanoato de etilo, nonanoato de etilo e oleato de etilo), procedeu-se primeiramente à preparação num balão volumétrico de 100 mL de uma solução *stock* global A aferido com uma solução *etanol-água* (50 % v/v) (Tabela 1). Seguidamente, retirou-se 10 mL desta solução global A que foi diluída para 50 mL, obtendo-se a solução B.

Tabela 4.1 – Preparação da solução *stock* global A.

Composto	Volume (µL)
Álcool isoamílico	4
Hexanoato de etilo	2,5
Octanoato de etilo	2
Nonanoato de etilo	2
Oleato de etilo	1

A partir da solução B, procedeu-se à preparação de diversos padrões (Tabela 4.2) para trabalho em balões de 50 mL, perfazendo o volume com água MiliQ™ (Milli-Q, Millipore, Bedford, USA) em que se ajustou o teor de álcool para 12 % no sentido de

obter uma matriz mais próxima possível da aguardente real, e que ao mesmo tempo minimize a influência do etanol na taxa de extracção dos analitos de interesse (certos estudos como os efectuados por Pino *et al.* (2001) demonstraram que a um teor de etanol acima ou abaixo de 12 %, corresponde uma menor taxa de extracção de certos compostos, como os ésteres etílicos).

Tabela 4.2 – Preparação dos padrões para a curva calibração.

Padrão	Volume de B (mL)	Volume Padrão interno (mL)	Volume de etanol (mL)
1	0,5	0,5	5,50
2	1	0,5	5,25
3	2	0,5	4,75
4	3	0,5	4,25
5	5	0,5	3,25
6	7	0,5	2,25

4.1.1.1 – Limite de Detecção, *LOD* (do inglês, *Limit of Detection*)

O limite de detecção para cada um dos compostos em estudo foi estimado a partir da curva de calibração, sendo a concentração calculada igual a três vezes o desvio-padrão do sinal do branco (Miller & Miller, 2000).

4.1.2 – Preparação da Amostra

Antes da extracção por SPME (*Micro-extracção em Fase Sólida*) e análise por GC-MS procedeu-se à preparação das amostras. Em relação aos 4 ésteres em estudo, diluiu-se as amostras 12,5 vezes (retirou-se 4 mL de aguardente de cana-de-açúcar e transferiu-se para um balão volumétrico de 50 mL). Por outro lado, no que concerne ao álcool isoamílico, as amostras foram diluídas 1250 vezes (retirou-se 40 µL de aguardente de cana-de-açúcar e transferiu-se para um balão volumétrico de 50 mL).

Posteriormente adicionou-se ao balão 0,5 mL do composto utilizado com padrão interno, 1-Butanol (1001.4 mg/L), ajustou-se o teor de álcool para 12 % (através da adição de etanol puro) e aferiu-se de seguida o volume com água MilliQ™.

Após a aferição e homogeneização, retirou-se 10 mL da solução e transferiu-se para um *via*/ de 15 mL que continha 1,75 gramas de Cloreto de Sódio (NaCl). A adição de NaCl aumenta a força iónica da solução, facilitando a extracção de compostos voláteis por SPME.

4.2 – Extracção por SPME

A fibra de poliacrilato (85 μm) utilizada nas extracções foi inicialmente acondicionada durante 2 horas a 300°C na porta de injeção do cromatógrafo, conforme as instruções do fabricante (Supelco, Inc., USA).

O *vial* contendo a solução preparada para a extracção (padrão ou amostra) foi submetida à extracção por SPME (Fig. 4.1). Para a extracção foi adoptado com alguns ajustes a metodologia optimizada por Nonato *et al.* (2001), sendo que a amostra foi submetida à extracção durante 25 minutos, tempo necessário para que a adsorção dos analitos por parte da fibra utilizada complete e se atinja o equilíbrio. A fibra de poliacrilato foi a escolhida uma vez que proporciona uma boa taxa de extracção para os analitos de interesse. A velocidade de agitação em cada extracção foi de 500 r.p.m.

Todas as amostras ou padrões foram submetidas à extracção a uma temperatura de 65 °C. De acordo, com Nonato *et al.* (2001) nas condições optimizadas, entre 60 e 70 °C, a taxa pela qual os analitos são adsorvidos pela fibra é máxima e não varia significativamente.



Fig. 4.1 – Extracção de compostos voláteis por HS-SPME.

4.3 – Análises por GC-MS

Após preparação e extracção da amostra por SPME, a fibra de poliacrilato utilizada durante a extracção foi imediatamente transferida para o injector do aparelho de GC-MS, tendo-se estabelecido o tempo de desorção em 3 minutos (tempo necessário de acordo com Nonato *et al.* (2001) para que as amostras se desorvam da fibra e passem para a coluna cromatográfica).

As análises em modos de varrimento e *SIM* (ambas em modo *splitless*) foram levadas a cabo num cromatógrafo a gás de marca "Shimadzu" acoplado a um detector de massa. A coluna utilizada foi uma SPB-5 (30 m de comprimento × 0,250 mm de diâmetro x 0.250 µm de espessura).

O programa de temperatura utilizado foi: 40 °C (permanecendo durante 5 min a esta temperatura), aumentado à taxa de 5 °C/min até 100 °C e à taxa de 10 °C/min até 240 °C (permanecendo durante 15 min a esta temperatura). A temperatura do injector durante as análises foi de 240°C enquanto que o detector funcionou durante as mesmas em modo de impacto electrónico (70 eV) a 280 °C.

4.3.1 – Análises Qualitativas (análises em modo de *Varrimento* ("*Scan*")

Nas determinações qualitativas (análises em modo de varrimento), definiu-se para análise, o intervalo de aquisição compreendido 29 e 400 m/z.

Os compostos obtidos através da análise em modo de varrimento foram identificados, numa primeira fase utilizando as livrarias digitais NIST62TM e WILLEY229TM e numa segunda fase através da comparação dos respectivos espectros obtidos com os espectros referidos na literatura.

4.3.2 – Análises Quantitativas (análises em modo de *Monitoramento Iónico Selectivo*, "*SIM*" (do inglês, *Selected Ion Monitoring*))

Nas determinações quantitativas (análises em modo *SIM*) definiu-se os iões principais e de confirmação correspondentes aos compostos que se pretendia quantificar tendo em conta os intervalos de tempo de retenção em que os mesmos "abandonam" da coluna (obtidos através da análise em modo de varrimento das amostras e dos respectivos padrões). Todas as amostras foram analisadas em duplicado neste modo.

4.4 – Análise Multivariada

A análise multivariada consistiu na utilização de técnicas de reconhecimento de padrões sem supervisão (com o auxílio de softwares estatísticos como o *Minitab*TM e o *MatLab*TM) como a Análise em Componentes Principais e Análise Hierárquica de Grupos no sentido de verificar uma eventual formação de dois grupos distintos por parte das duas aguardentes de cana-de-açúcar em estudo com base nos seus teores de álcool isoamílico, hexanoato de etilo, octanoato de etilo, nonanoato de etilo e oleato de etilo.

Capítulo 5

Resultados e Discussão

5.1 – Análise Qualitativa

5.1.1 – Análise qualitativa às amostras de aguardente de cana-de-açúcar de Cabo Verde

A análise qualitativa efectuada à aguardente de cana-de-açúcar de Cabo Verde conduziu à identificação de 31 compostos (Figura 5.2 e Tabela 5.2), provando a eficácia do método adaptado. Contudo, o número de compostos identificados estará em defeito, isto porque, a co-eluição do álcool etílico (que embora tenha sido minimizado através do ajustamento da graduação alcoólica para 12% v/v, não pôde ser eliminada completamente) terá tido como consequência, a não separação dos picos correspondentes ao éster acetato de etilo (o éster mais abundante nas bebidas alcoólicas) e aos álcoois 1-propílico e isobutílico.

De facto, o acetato de etilo e os álcoois 1-propílico e isobutílico têm tempos de retenção próximos do tempo de retenção do álcool etílico, sendo por isso afectados pela co-eluição do etanol. Para além da co-eluição do etanol, (que terá sido o factor primário para a não separação dos picos correspondentes ao acetato de etilo, e aos álcoois 1-propílico e isobutílico), as próprias condições experimentais (ex. tipo de coluna de cromatográfica) não terão sido as mais adequadas para a separação dos picos correspondentes aos três compostos supracitados.

Esta última suposição é confirmada analisando a aguardente de cana-de-açúcar de Cabo Verde (Tabela 5.1 e Fig. 5.1) por injeção indirecta, técnica que embora conduza à identificação de um número relativamente menor de compostos, permite a identificação do éster acetato de etilo e dos álcoois 1-propílico e isobutílico.

Na análise por injeção indirecta, 1 μ L de aguardente de cana-de-açúcar de Cabo Verde foi injectado directamente numa coluna *DB-Wax da J&W Scientific* com 30 m de comprimento, 0,32 mm de diâmetro interno e 0,5 μ m de espessura de filme. A quantificação foi feita utilizando 4-metil-2-pentanol como padrão interno.

Tabela 5.1 – Compostos identificados pela análise da aguardente de cana-de-açúcar de Cabo Verde por injeção directa.

ID	Composto	Tempo de Retenção (min)
1	Acetato de Etilo	2,44
2	Álcool Etílico	2,77
3	1-propanol (álcool n-propílico)	4,94
4	Isobutanol (álcool isobutílico)	6,96
5	Isopentanois (2-metil-1-butanol + 3-metil-1-butanol)	13,06
6	Heptanoato de etilo	18,64
7	Octanoato de etilo	22,15
8	Nonanoato de etilo	24,97

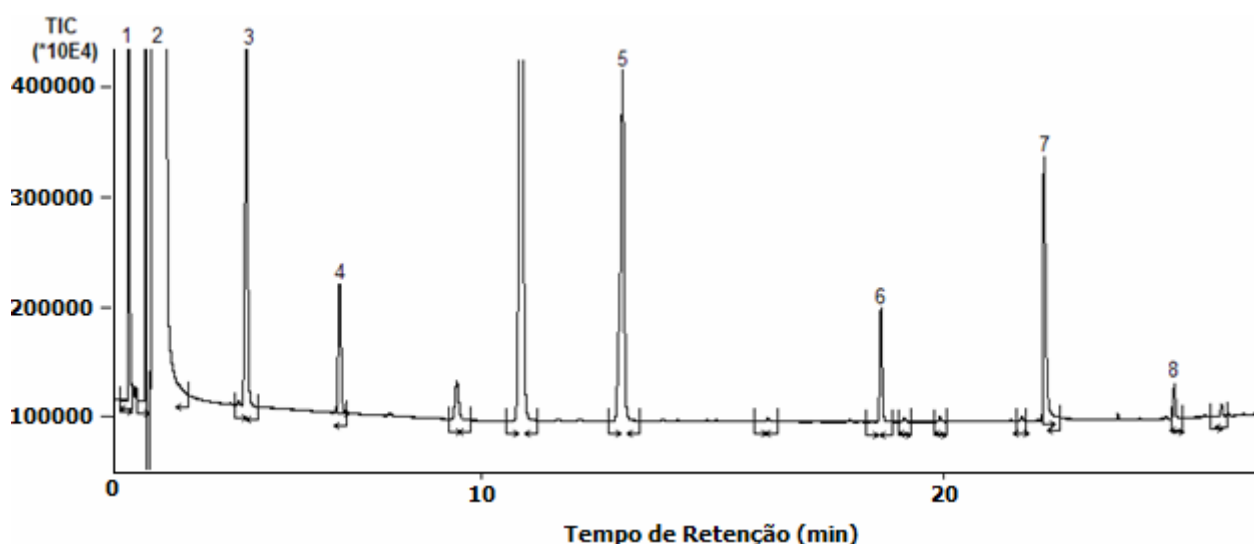


Fig. 5.1 – Cromatograma da análise da aguardente de cana-de-açúcar de Cabo Verde por injeção directa.

Verifica-se pela análise da Fig. 5.1 que os picos correspondentes ao acetato de etilo e aos álcoois 1-propílico e isobutílico aparecem claramente separados do pico correspondente ao etanol. Todavia, facilmente depreende-se também que a técnica de injeção directa conduz à identificação de um número relativamente muito menor de compostos quando comparada com técnica de HS-SPME.

É interessante notar que Nonato *et al.* (2001) utilizando a mesma técnica de extracção que a utilizada neste trabalho (HS-SPME) e analisando as amostras de aguardente de cana-de-açúcar brasileira por GC-FID conseguiram obter cromatogramas em que os picos correspondentes aos três compostos referidos apareciam claramente

separados (não obstante ao facto de, por outro lado, não terem conseguido com a técnica utilizada pelos mesmos, conforme referido mais adiante, detectar a presença de vários outros compostos, os quais foram detectados pela técnica adaptada no presente estudo). Este facto dever-se-á às seguintes razões: na técnica adaptada no presente no estudo, utilizou-se uma coluna cromatográfica diferente e as condições de operação do aparelho de cromatografia gasosa foram ligeiramente diferentes das utilizadas no estudo efectuado por Nonato *et al.* (2001).

Tabela 5.2 – Compostos identificados no "head-space" da aguardente de cana-de-açúcar de Cabo Verde.

N.º	Composto	Tempo de Retenção (min)	Espectro de Massa
1	Álcool Etílico	2,519	31,45
2	Álcool isoamílico (3-metil-1-butanol)	5,588	41,55,42,70,29
3	Hexanoato de etilo	15,573	88,43,29,60,45,
4	Ácido Hexanoico	16,146	60,73,45,29, 87
5	Heptanoato de etilo	19,023	88,43,29,45,60,41,73
6	Álcool feniletílico	19,743	91,122,65
7	Mandelato de etilo	21,172	107,79,77,29,105
8	Octanoato de etilo	21,574	88,29,41,57,73,
9	Acetato feniletílico	22,921	104,43,91,65,39
10	Ácido Dietilacético	23,623	43,88,73,29,41
11	3-Metil-2-heptanol	23,874	45,43,41,29,55
12	Ácido Decanoico (Ácido cáprico)	25,250	60,73,41,43,57,55,129
13	Ácido Undecanoico	25,324	60,73,41,43,55,29
14	Nonanoato de etilo	25,398	88,41,101,29,55,43,141
15	3-metilbutil-octanoato	26,197	70,43,57,55,71,41
16	Beta-Farnesene	26,421	41,69,93,81,55,79
17	2-Undecanol	27,200	45,43,41,55,
18	Nerolidol	28,071	41,69,43,93,71
19	Tridecanoato de etilo	28,396	88,43,41,55,73,57
20	3-Metilbutil-decanoato	29,075	70,43,71,55,41
21	Isobutirato feniletílico	29,173	104,43,71,91,41
22	4-(2,2,6-Trimetilciclohexil)-2-butanol	29,947	69,41,67,55,81
23	Cis-Farnesol	30,297	69,41,81,93,55
24	Pentadecanoato de etilo	30,949	88, 101,41,43,55,57,29,73
25	Acetato farnesílico	31,575	69,41,93,43,71
26	Hexadecanoato de etilo	32,200	88,101,41,43,55,29,157
27	6,10,14-Trimetil-2-pentadecanona	32,348	43,58,71,57,41,55
28	Ácido Hexadecenoico	33,323	55,41,69,43,83,29
29	Heptadecanoato de etilo	33,646	88,101,43,55
30	Oleato de etilo	36,746	55,69,88,41,83
31	Nonadecanoato de etilo	37,249	88,43,41,101,55

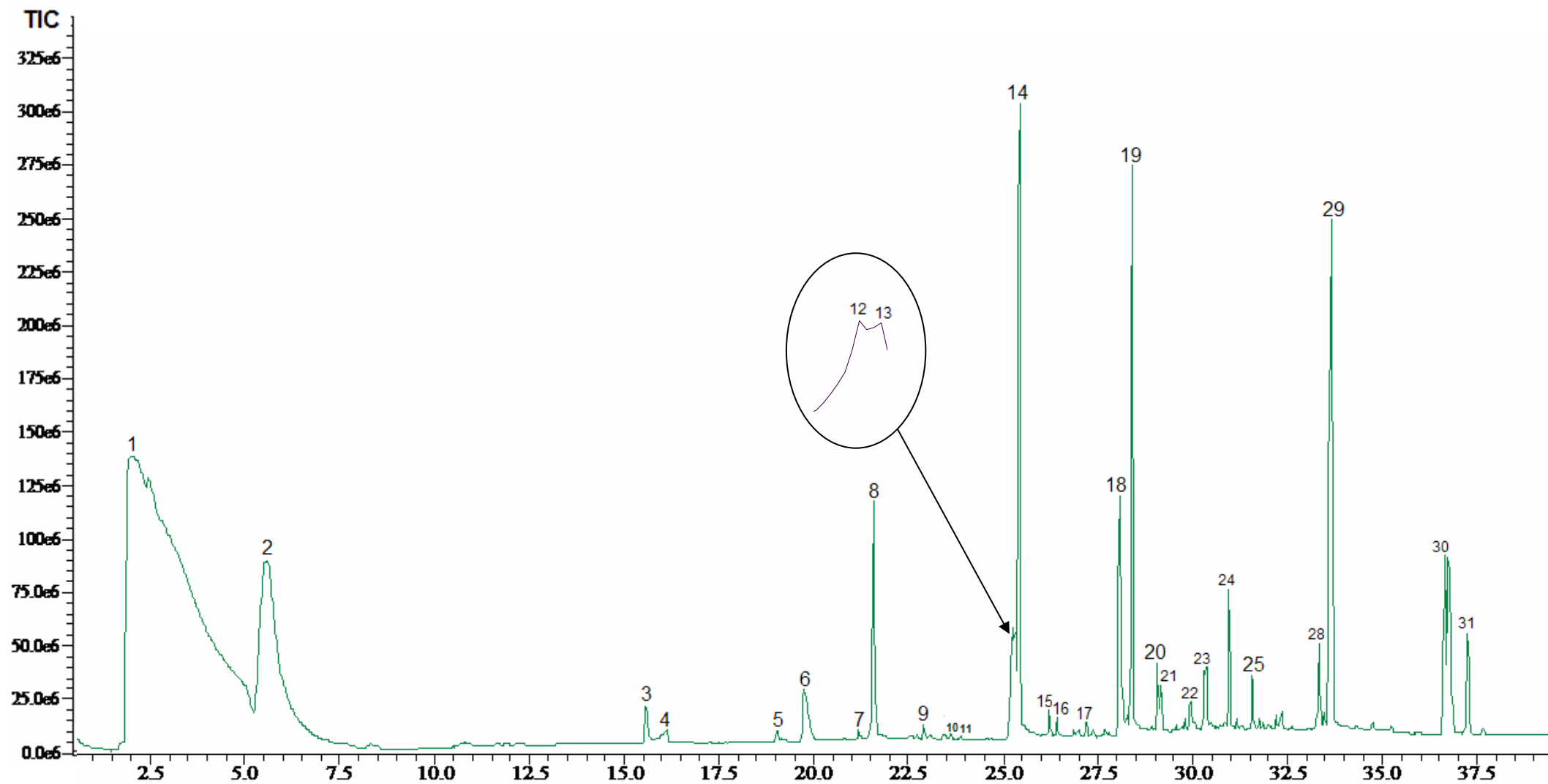


Fig. 5.2 – Cromatograma da aguardente de cana-de-açúcar de Cabo Verde obtido pela análise por HS-SPME/GC-MS.

5.1.2 – Análise qualitativa às amostras de aguardente de cana-de-açúcar brasileira

A análise qualitativa efectuada à aguardente de cana-de-açúcar brasileira conduziu à identificação de 35 compostos (Fig. 5.3), um número ligeiramente superior ao número de compostos identificados no "*head-space*" da aguardente de cana-de-açúcar de Cabo Verde. O número de compostos identificados neste caso, tal como para o caso da aguardente de cana-de-açúcar de Cabo Verde, estará em defeito, visto que também neste caso, a co-eluição do etanol não terá permitido a separação dos picos correspondentes ao éster acetato de etilo e aos álcoois 1-propil e isobutílico.

Na Tabela 5.3, apresenta-se os compostos identificados no "*head-space*" da aguardente de cana-de-açúcar brasileira e os respectivos tempos de retenção.

Tabela 5.3 – Compostos identificados no "head-space" da aguardente de cana-de-açúcar brasileira.

N.º	Composto	Tempo de Retenção (min)	Espectro de Massa
1	Álcool etílico	2,595	31,45
2	Álcool isoamílico (3-metil-1-butanol)	6,316	41,55,42,70,29
3	Acetato de 3-metilbutilo	11,848	43,70,55,41,21,42,39,29
4	Hexanoato de etilo	16,866	88,43,29,60,45,
5	3-Metil-2-heptanol	20,331	45,43,41,55,57
6	Álcool feniletílico	20,813	91,122,65
7	Octanoato de etilo	22,629	88,29,41,57,73,101
8	Ácido Octanoico	22,916	60,73,43,41,55,29
9	Álcool caprílico	24,298	41,56,43,55
10	Nonanoato de etilo	24,6162	88,41,101,29, 55,43,141,
11	Caprilato de Butilo	25,564	56,57,41,145,127
12	9-oxo-nonanoato de etilo	26,447	88,41,101, 60,73,29,43,55
13	3-metilbutil-octanoato	27,214	70,41,43,55,127,57,71,29,
14	1-Dodecanol	27,713	43,55,41,56,69
15	Decanoato de etilo	27,933	88,101,29,41,43,73,55,
16	Decanoato de butilo	28,679	56,173,41,57,155,43
17	Nerolidol	29,100	41,69,43,93,71
18	Ácido Undecanoico	29,198	60,73,41,43,55,29
19	Ácido Dodecanoico	29,450	88,55,101,41,29
20	4-metil-Hexanal	30,096	70,57,55,41,43
21	1-Dodecanol	30,563	43,41,55,56
22	Beta-Citronelol	30,799	69,41,67,55,81
23	Ácido Oleico	31,005	55,69,43,41,83
24	Cis-Farnesol	31,215	69,41,81,93,55
25	2-Metil-1-pentadeceno	31,364	56,57,43,41,55
26	Tridecanoato de etilo	31,847	88,55,41,101,69
27	Pentadecanoato de etilo	32,000	88,101,41,43,55,57,
28	4-(2,2,6-Trimetilciclohexil)-2-butanol	32,266	69,41,67,55,81
29	Acetato farnesílico	32,715	69,41,93,43,71
30	Isovalerato feniletílico	32,931	104,57,105,41
31	Hexadecanoato de etilo	33,382	88,101,43,41,55
32	Oleato de etilo	34,282	55,41,69,43,83,29,88,101
33	Nonadecanoato de etilo	34,982	88,43,41,101,55,57
34	Hexanoato feniletílico	36,314	104,105,43,41,55
35	Octanoato feniletílico	36,315	104,105,43,41

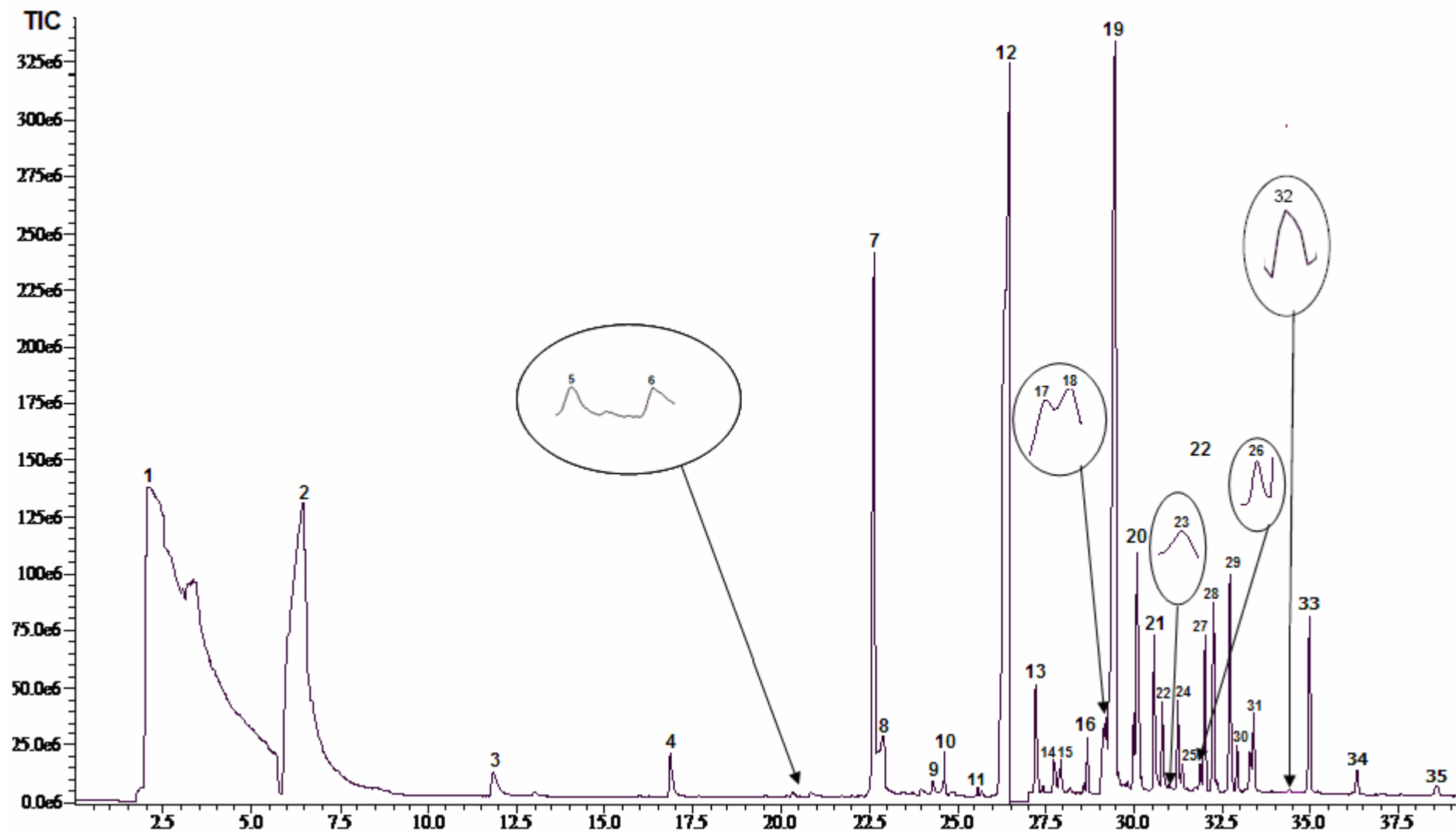


Fig. 5.3 – Cromatograma da aguardente de cana-de-açúcar brasileira obtido por HS-SPME/GC-MS.

5.13 – Comparação Aguardente de cana-de-açúcar de Cabo Verde/Cachaça

Pela observação dos compostos identificados através das análises em modo de varrimento da aguardente de cana-de-açúcar do Brasil constata-se que a maioria dos mesmos já foram referenciados como estando presentes no "*head-space*" da aguardente de cana-de-açúcar brasileira por vários estudos anteriores, com destaque para os de Nonato *et al.* (2001) e Nóbrega (2003).

De facto, além do álcool etílico (composto, que obviamente seria de esperar que estivesse presente no "*head-space*", atendendo ao facto de ser o álcool mais abundante nas bebidas alcoólicas), 13 dos compostos químicos identificados: álcool isoamílico (3-metil-1-butanol), o hexanoato de etilo, álcool feniletílico, o octanoato de etilo, o ácido octanoico, o álcool caprilico, o decanoato de etilo, o nerolidol, o ácido dodecanoico, o β -citronelol, o cis-farnesol, o pentadecanoato de etilo e o hexadecanoato de etilo já foram referenciados anteriormente por Nonato *et al.* (2001). Outros compostos químicos identificados como o nonanoato de etilo, o 3-metilbutil-octanoato e o acetato de 3-metilbutilo já foram também referenciados por Nóbrega (2003) anteriormente como fazendo parte do "*head-space*" da aguardente de cana-de-açúcar brasileira.

Não obstante ao facto de a maioria dos compostos identificados no "*head-space*" do cachaça, constata-se que 14 dos compostos químicos identificados (Tabela 5.4) não foram referenciados por nenhum dos autores referidos anteriormente nas várias cachaças analisadas pelos mesmos. Este facto mostra que o método adaptado utilizado, apesar das limitações referidas anteriormente, tem algumas vantagens.

Tabela 5.4 – Compostos químicos identificados não referenciados por Nonato *et al.* (2001) e Nóbrega (2003) como estando presentes no "head-space" da cachaça.

N.º	Composto	Tempo de Retenção (min)	Espectro de Massa
1	3-Metill-2-heptanol	20,331	45,43,41,55,57
2	Caprilato de Butilo	25,564	56,57,41,145,127
3	9-oxo-nonanoato de etilo	26,447	88,41,101, 60,73,29,
4	Decanoato de butilo	28,679	56,173,41,57,155,43
5	4-metill-Hexanal	30,096	70,57,55,41,43
6	Ácido Oleico	31,005	55,69,43,41,83
7	2-Metil-1-pentadeceno	31,364	56,57,43,41,55
8	Ácido Undecanoico	31,847	88,55,41,101,69
9	4-(2,2,6-Trimetillciclohexil)-2-butanol	32,266	69,41,67,55,81
10	Acetato farnesílico	32,715	69,41,93,43,71
11	Isovalerato feniletílico	32,931	104,57,105,41
12	Nonadecanoato de etilo	34,982	88,43,41,101,55,57
13	Hexanoato feniletílico	36,314	104,105,43,41,55
14	Octanoato feniletílico	36,315	104,105,43,41

Alguns dos compostos referidos na Tabela 5.4 já foram referenciados como estando presentes no "head-space" de outras bebidas destiladas. Por exemplo, o octanoato feniletílico já foi referenciado como estando presente no "head-space" da tequila por Cordoba *et al.* (2004), que utilizaram a HS-SPME/GC-MS para determinação de compostos voláteis presentes no "head-space" da tequila enquanto que o ácido undecanoico já foi referenciado como sendo um composto comum no "head-space" de Conhaque por Ferrari *et al.* (2004) que também utilizaram a GC-MS.

Em relação à aguardente de cana-de-açúcar de Cabo Verde constata-se, como seria de esperar, que a maioria dos compostos identificados são iguais aos identificados no "head-space" da cachaça ou a outros já referenciados em outros estudos sobre cachaça. Contudo, é interessante notar que 12 dos compostos identificados (Tabela 5.5) não foram detectados nas amostras de cachaça analisadas.

Atendendo, ao elevado número de produtores de cachaça existentes nas diversas regiões do Brasil e por conseguinte, ao grande número de marcas existentes no mercado, não se pode afirmar absolutamente que tais compostos não existam em uma ou outra cachaça proveniente de um determinado produtor. Contudo, a ausência dos mesmos nas amostras analisadas, não deixa de constituir um factor indicativo de um provável carácter distinto dos dois tipos de aguardentes de cana-de-açúcar em estudo.

Tabela 5.5 – Compostos detectados no “*head-space*” da aguardente de cana-de-açúcar de Cabo Verde e ausentes nas cachaças analisadas.

N.º	Composto	Tempo de Retenção (min)	Espectro de Massa
1	Ácido Hexanoico	16,146	60,73,45,29, 87
2	Heptanoato de etilo	19,023	88,43,29,45,60,41,73
3	Mandelato de etilo	21,172	107,79,77,29,105
4	Acetato feniletílico	22,921	104,43,91,65,39
5	Ácido dietilacético	23,623	43,88,73,29,41
6	Ácido Decanoico	25,250	60,73,41,43,57,55,129
7	Beta-Farnesene	26,421	41,69,93,81,55,79
8	2-Undecanol	27,200	45,43,41,55,
9	3-Metilbutil-decanoato	29,075	70,43,71,55,41
10	Isobutirato Feniletílico	29,173	104,43,71,91,41
11	6,10,14-Trimetil-2-pentadecanona	32,348	43,58,71,57,41,55
12	Ácido Hexadecenoico	33,323	55,41,69,43,83,29

O heptanoato de etilo embora tenha sido somente detectado como estando presente no “*head-space*” das amostras de aguardente de Cabo Verde analisadas, não se pode afirmar absolutamente que o mesmo não se encontre nas cachaças analisadas (pode sim, estar presente em concentração vestigial, de tal modo que não seja possível a detecção do mesmo pela análise em modo de varrimento). Na verdade, Boscolo *et al.* (2000), utilizando a Cromatografia Gasosa de Alta Resolução – Detector de Ionização de Chama, *HRGC-FID* (do inglês, *High Resolution Gas Chromatography – Flame Ionization Detector*) conseguiram detectar a presença de heptanoato de etilo na cachaça. Entretanto, a detecção no presente trabalho do heptanoato de etilo em várias amostras da aguardente de cana-de-açúcar de Cabo Verde e em nenhuma amostra de cachaça, conjugado com o facto de outros investigadores como Nonato *et al.* (2001) utilizando a GC-MS não terem encontrado o referido éster em várias amostras de cachaças analisadas provenientes de diferentes regiões geográficas do Brasil, leva a crer que as concentrações do citado composto na aguardente de cana-de-açúcar de Cabo Verde poderão ser substancialmente maiores que as encontradas nas cachaças.

A mesma observação feita para o heptanoato de etilo poderá ser feita para o acetato feniletílico, que embora tenha sido detectado em várias amostras de aguardente de cana-de-açúcar de Cabo Verde, não foi detectado nas cachaças analisadas. Também, tal como para o caso do heptanoato de etilo, a presença do acetato feniletílico já foi referenciada anteriormente como estando presente no “*head-space*” da cachaça. Souza *et al.* (2006) utilizando a Cromatografia Gasosa – Olfactometria, *GCO* (do inglês, *Gas*

Chromatography-Olfactometry) conseguiram detectar a presença do acetato feniletílico no "head-space" da cachaça. O mesmo composto já foi detectado no "head-space" de outras bebidas destiladas como o calvado (bebida espirituosa produzida a partir da destilação da cidra) por Ledauphin *et al.* (2003) utilizando a extracção líquido-líquido seguido de análise por GC-MS e por Câmara *et al.* (2006) na análise de vinhos por HS-SPME/GC-MS.

O beta-farnesene e o 3-metilbutil-decanoato, embora não tenham sido detectados no "head-space" das cachaças em estudo, é razoável supor que os mesmos aí se encontrem, mas em baixas concentrações. Na verdade, Nonato *et al.* (2001) e Nóbrega (2003) relataram a presença dos citados compostos em cachaças de diversas origens.

O ácido gordo decanoico, embora também não tenha sido detectado como estando presente no "head-space" das cachaças analisadas, é razoável assumir que o mesmo aí se encontre, mas em baixa concentração. De facto, a detecção da presença do decanoato de etilo (que por sua vez, forma-se por reacção do ácido decanoico com o etanol) no "head-space" nas cachaças analisadas, sugere a presença do ácido decanoico (ainda que em baixas concentrações) no "head-space" das cachaças analisadas. Em relação ao ácido hexanoico, a presença de hexanoato de etilo, providencia também uma clara indicação da presença do mesmo no "head-space" das cachaças analisadas ainda que em baixas concentrações. Isto porque, tal como para os outros ésteres, o hexanoato de etilo forma-se da reacção de um ácido orgânico (neste caso, o ácido hexanoico) com o etanol.

As mesmas assumções feitas para o ácido decanoico e hexanoico poderão ser feitas para o ácido hexadecenoico. Embora não tenha sido identificado no "head-space" das cachaças analisadas, é razoável assumir também neste caso, que o mesmo possa aí se encontrar numa concentração, tal que não possa ser detectado pela técnica em uso.

Dos compostos identificados como estando presentes no "head-space" da aguardente de cana-de-açúcar de Cabo Verde e ausentes nas cachaças analisadas, realça-se também a cetona 6,10,14-Trimetil-2-pentadecanona (Fig. 5.4). Embora seja um composto aparentemente ainda não referenciado nos principais estudos sobre a cachaça como sendo comum no "head-space" da mesma, é de referir que existem trabalhos que relatam a presença do mesmo no "head-space" de alguns vinhos. De facto, Tsakiris *et al.* (2004) utilizando a HS-SPME/GC-MS conseguiram detectar a presença da 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona em vários vinhos tintos. Tratando-se de uma cetona, a sua presença na aguardente de cana-de-açúcar estará relacionada com processos de fermentação

secundária e possível contaminação durante o processo de produção (Cardoso *et al.*, 2003).

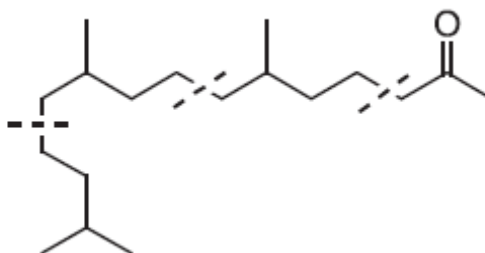


Fig. 5.4 – Estrutura molecular da 6,10,14-Trimetil-2-pentadecanona (Mastelic *et al.*, 2006).

5.2 – Análise Quantitativa

5.2.1 – Curvas de Calibração

Os coeficientes de determinação, R^2 , (Tabela 5.6) das curvas de calibração obtidas através das análises dos diferentes padrões encontram-se muito próximos de 1 (que é o ideal), enquanto que os limites de detecção obtidos, *LOD* (do inglês *Limit Of Detection*) encontram-se todos abaixo das concentrações mínimas dos compostos encontradas nas amostras (com exceção para o nonanoato de etilo, em que três amostras apresentam concentrações do mesmo abaixo do *LOD*).

Tabela 5.6 – Parâmetros das curvas de calibração e limites de detecção para o álcool isoamílico, o hexanoato de etilo, o octanoato de etilo, o nonanoato de etilo e o oleato de etilo.

Compostos	Intervalo de concentrações (mg/L)	Coeficiente de determinação (R^2)	LOD (mg/L)
Álcool isoamílico	0,0647 – 0,9061	0,9993	0,0337
Hexanoato de etilo	0,0871 – 0,6097	0,9960	0,0558
Octanoato de etilo	0,0347 – 0,4855	0,9948	0,0293
Nonanoato de etilo	0,0346 – 0,3464	0,9956	0,0283
Oleato de etilo	0,0174 – 0,2436	0,9973	0,0168

5.2.2 – Resultados das análises às amostras de aguardente de cana-de-açúcar de Cabo Verde e aguardente de cana-de-açúcar brasileira.

As Tabelas 5.7 e 5.8 mostram, respectivamente, os resultados das análises às amostras das duas aguardentes em estudo para os teores de álcool isoamílico, hexanoato de etilo, octanoato de etilo, nonanoato de etilo e oleato de etilo e as médias das concentrações dos citados compostos nos dois tipos de aguardentes de cana-de-açúcar em estudo.

As concentrações do álcool isoamílico nas amostras de aguardente de cana-de-açúcar de Cabo Verde variam entre um mínimo de 652,733 mg/L e um máximo de 776,088 mg/L, enquanto que na cachaça varia entre um mínimo de 985,500 mg/L e um máximo de 1114,091 mg/L.

Em relação ao hexanoato de etilo, os resultados para as concentrações variam entre um mínimo de 1,252 mg/L e um máximo de 4,402 mg/L para as amostras de aguardente de cana-de-açúcar de Cabo Verde, e entre um mínimo de 1,316 mg/L e um máximo de 2,119 mg/L para as amostras de cachaça.

No que concerne ao octanoato de etilo, os valores das concentrações variam entre um mínimo de 1,160 mg/L e um máximo de 3,086 mg/L para as amostras de aguardente de cana-de-açúcar de Cabo Verde, e entre um mínimo de 1,358 mg/L e um máximo de 4,922 mg/L para as amostras de cachaça.

Para o nonanoato de etilo, os valores das concentrações variam entre um mínimo abaixo do LOD (Limite de Detecção) e um máximo de 1,202 mg/L para as amostras de aguardente de cana-de-açúcar de Cabo Verde, e entre um mínimo de 0,533 mg/L e um máximo de 2,691 mg/L para as amostras de cachaça.

Finalmente, em relação ao oleato de etilo os valores das concentrações variam entre um mínimo de 0,111 mg/L e um máximo de 0,262 mg/L para as amostras de aguardente de cana-de-açúcar de Cabo Verde, e entre um mínimo de 0,117 mg/L e um máximo de 0,187 mg/L para as amostras de cachaça.

Tabela 5.7 – Resultados das análises às amostras de aguardente de cana-de-açúcar de Cabo Verde e aguardente de cana-de-açúcar brasileira com os respectivos desvios-padrão relativos, *RSD* (do inglês, *Relative Standard Deviation*) (valor médio \pm *RSD*).

Amostras	Código	Álcool isoamílico (mg/L)	Hexanoato de etilo (mg/L)	Octanoato de etilo (mg/L)	Nonanoato de etilo (mg/L)	Oleato de etilo (mg/L)
ACA-CV	ACV1	776,1 \pm 0,70	1,267 \pm 2,08	1,288 \pm 5,31	0,804 \pm 14,07	0,184 \pm 6,76
ACA-CV	ACV2	705,6 \pm 1,11	1,673 \pm 7,92	3,086 \pm 15,61	<LOD	0,222 \pm 8,84
ACA-CV	ACV3	701,2 \pm 1,30	4,377 \pm 7,36	1,160 \pm 5,09	0,464 \pm 12,46	0,262 \pm 5,70
ACA-CV	ACV4	748,3 \pm 0,93	2,682 \pm 4,15	1,305 \pm 18,81	1,192 \pm 4,37	0,137 \pm 6,30
ACA-CV	ACV5	697,2 \pm 0,21	2,544 \pm 2,03	1,444 \pm 0,70	1,202 \pm 1,54	0,111 \pm 1,47
ACA-CV	ACV6	775,0 \pm 0,28	1,252 \pm 1,23	1,171 \pm 1,71	0,638 \pm 4,33	0,181 \pm 5,08
ACA-CV	ACV7	652,7 \pm 1,06	1,682 \pm 1,61	2,868 \pm 1,93	<LOD	0,249 \pm 0,82
ACA-CV	ACV8	660,5 \pm 1,50	1,734 \pm 2,53	2,737 \pm 0,71	<LOD	0,222 \pm 3,71
ACA-CV	ACV9	712,2 \pm 2,01	4,402 \pm 0,91	1,226 \pm 1,45	0,459 \pm 3,77	0,237 \pm 2,73
Cachaça	BR1	1101,4 \pm 1,05	2,091 \pm 3,10	4,423 \pm 0,41	2,691 \pm 3,32	0,171 \pm 2,61
Cachaça	BR2	1107,5 \pm 0,69	2,119 \pm 5,17	4,922 \pm 1,70	2,316 \pm 2,46	0,123 \pm 5,89
Cachaça	BR3	1088,0 \pm 0,50	1,316 \pm 4,96	1,358 \pm 11,01	0,550 \pm 1,93	0,187 \pm 0,74
Cachaça	BR4	1069,6 \pm 0,43	1,556 \pm 1,78	1,534 \pm 2,44	0,533 \pm 6,73	0,178 \pm 1,78
Cachaça	BR5	1114,1 \pm 0,45	1,879 \pm 8,43	4,108 \pm 0,63	2,317 \pm 2,32	0,117 \pm 3,15
Cachaça	BR6	985,5 \pm 0,69	1,462 \pm 2,59	1,555 \pm 1,78	0,558 \pm 3,02	0,168 \pm 4,45
Cachaça	BR7	1061,2 \pm 0,82	1,328 \pm 2,52	1,645 \pm 4,71	0,678 \pm 1,53	0,161 \pm 5,44

ACA-CV = Aguardente de cana-de-açúcar de Cabo Verde;

<LOD = Abaixo do Limite de Detecção.

5.2.2.1 – Médias e coeficientes de variação

Pela observação da Tabela 5.8 verifica-se que os coeficientes de variação relativos às concentrações do álcool isoamílico são relativamente menores quando comparados com os coeficientes de variação relativos aos restantes compostos em estudo. Pela observação da mesma Tabela constata-se também que o nonanoato de etilo é o composto que apresenta maiores coeficientes de variação.

Tabela 5.8 – Médias das concentrações e respectivos coeficientes de variação (CV) ($\text{média} \pm \text{CV}$) dos compostos em estudo nas duas variedades de aguardente.

Amostras	Álcool isoamílico (mg/L)	Hexanoato de etilo (mg/L)	Octanoato de etilo (mg/L)	Nonanoato de etilo (mg/L)	Oleato de etilo (mg/L)
ACA-CV	714,320 \pm 6,24	2,402 \pm 51,23	1,809 \pm 45,57	0,529 \pm 90,30	0,200 \pm 25,60
Cachaça	1075,325 \pm 4,10	1,678 \pm 20,64	2,792 \pm 57,40	1,378 \pm 72,88	0,158 \pm 17,20

5.2.2.2. – Gráficos de caixa ("*box plot*")

Nos gráficos caixa ("*box plot*") o corpo principal dos dados é representado por uma caixa cujo topo e a base são definidos pelos percentis 25 (1º Quartil) e 75 (3º Quartil), respectivamente. O quadrado dentro da caixa corresponde à mediana. As linhas que têm origem nos limites da caixa estendem-se até aos valores mínimo e máximo.

5.2.2.2.1 – Álcool isoamílico

Pela observação do gráfico de caixa ("*box plot*") para o álcool isoamílico (obtido através de SPSS™ 14.0) (Fig. 5.5), verifica-se que a concentração do mesmo é significativamente diferente nos dois tipos de aguardentes de cana-de-açúcar em estudo, ou seja, por outras palavras, a concentração do álcool isoamílico na aguardente de cana-de-açúcar de Cabo Verde é significativamente inferior quando comparada com a concentração do mesmo composto na cachaça.

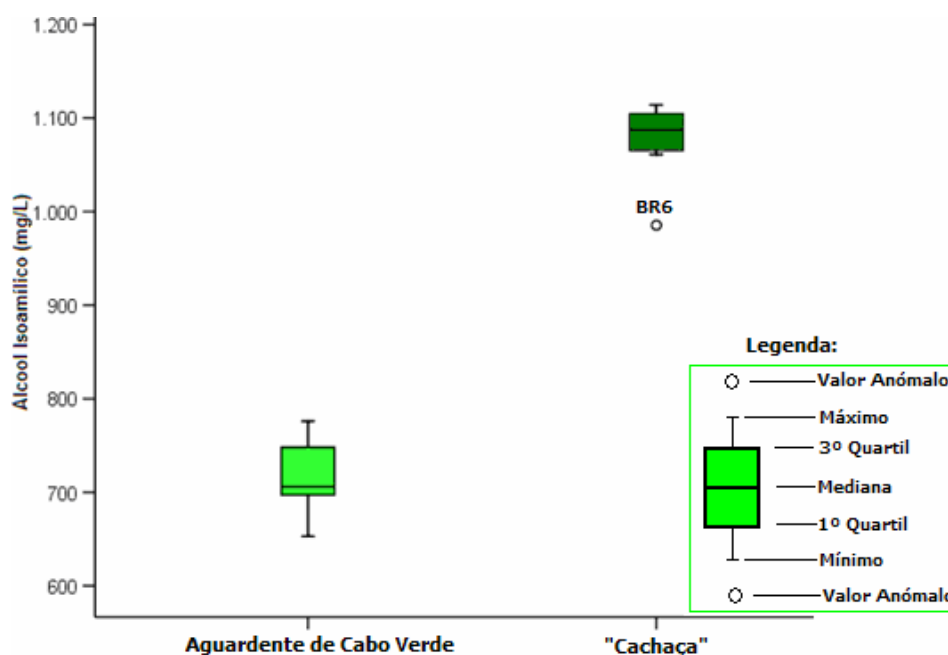


Fig. 5.5 – Gráfico de caixa para a concentração do álcool isoamílico.

A observação da Fig. 5.5 denota também a presença de um valor anómalo referente à amostra BR6, o qual apresenta um teor de álcool isoamílico que diverge, em certa medida, dos teores encontrados nas restantes amostras de cachaça.

O álcool isoamílico apresenta-se neste estudo em concentrações relativamente elevadas quando comparadas com as dos outros quatro compostos em estudo. De facto, como seria de esperar (tal como referido em vários estudos), o álcool isoamílico apresenta-se como o composto dominante no "*head-space*" da aguardente de cana-de-açúcar de Cabo Verde não só em relação aos quatro compostos em estudo, mas também em relação aos restantes compostos detectados.

5.2.2.2.2 – Hexanoato de etilo

Em relação ao hexanoato de etilo, pode-se verificar pela observação do respectivo gráfico de caixa (Fig. 5.6) que a concentração do mesmo não é significativamente diferente nos dois tipos de aguardentes de cana-de-açúcar em estudo.

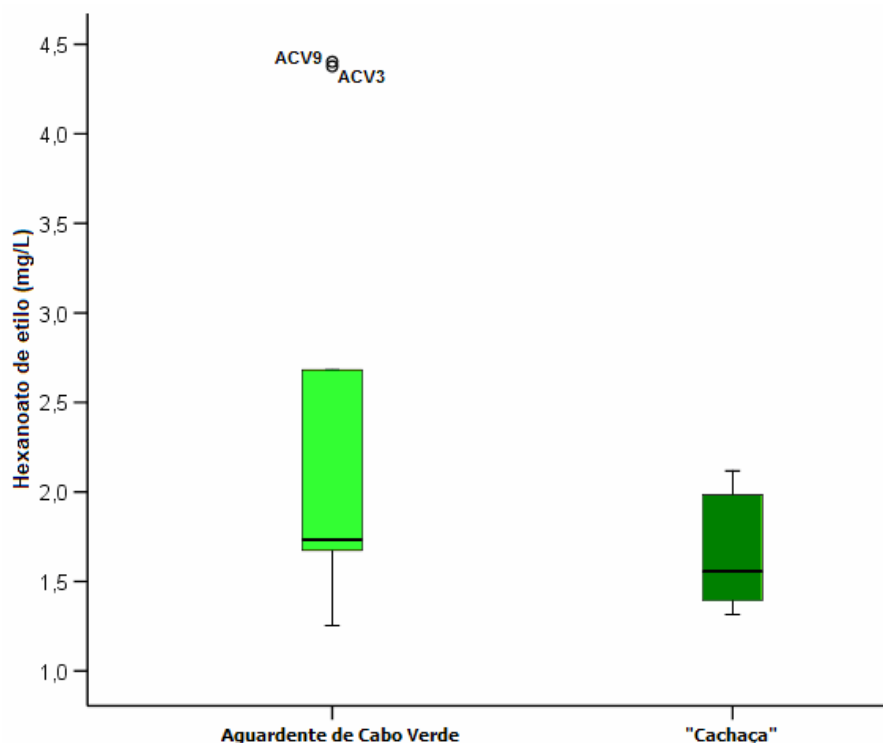


Fig. 5.6 – Gráfico de caixa para a concentração do hexanoato de etilo.

Pela observação da Fig. 5.6 constata-se também a presença de dois valores anómalos referentes às amostras ACV3 e ACV9, os quais apresentam teores de hexanoato de etilo que divergem, em certa medida, dos teores encontrados nas restantes amostras de aguardente de cana-de-açúcar de Cabo Verde.

5.2.2.2.3 – Octanoato de etilo

Tal como para o caso do hexanoato de etilo, pode-se verificar pela observação do gráfico de caixa do octanoato de etilo (Fig. 5.7) que a concentração do mesmo também não é significativamente diferente nos dois tipos de aguardentes de cana-de-açúcar em estudo. Contudo, denota-se que a variabilidade dos resultados para o octanoato de etilo nas amostras de cachaça é muito maior quando comparada com a variabilidade dos resultados para o mesmo composto nas amostras de aguardente de cana-de-açúcar de Cabo Verde. Este facto contribui para que as duas variedades de aguardente de cana-de-açúcar não sejam significativamente diferentes no que concerne aos teores de octanoato de etilo.

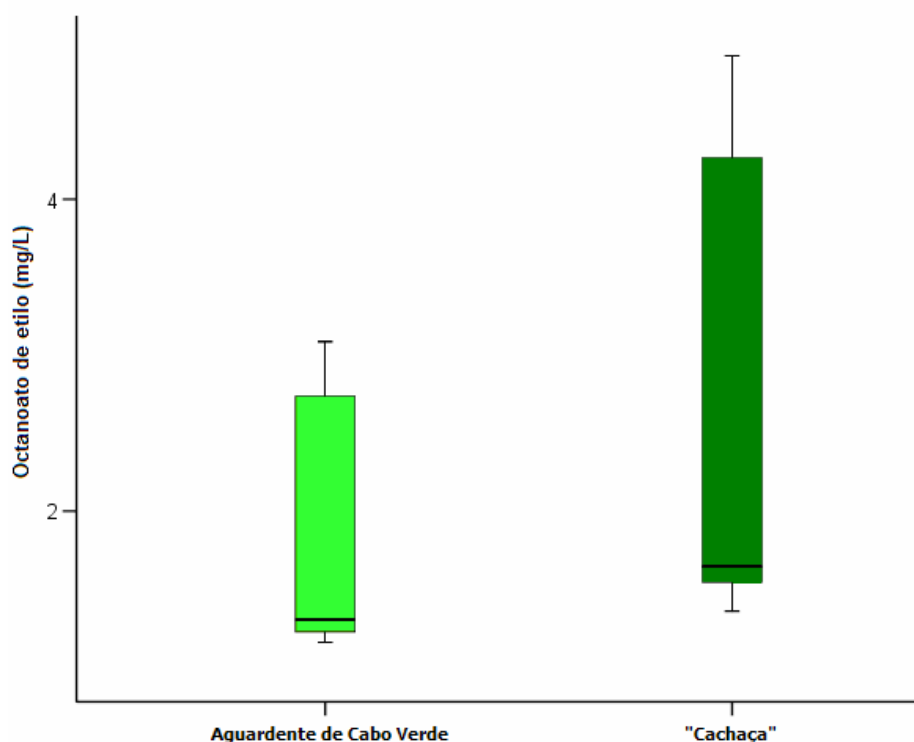


Fig. 5.7 – Gráfico de caixa para a concentração do octanoato de etilo.

5.2.2.2.4 – Nonanoato de etilo

Semelhantemente aos dois últimos casos, pode-se verificar pela observação do gráfico de caixa do nonanoato de etilo (Fig. 5.8) que a concentração do mesmo também não é significativamente diferente nos dois tipos de aguardentes de cana-de-açúcar em estudo. Similarmente ao octanoato de etilo, pode-se verificar também neste caso, que a variabilidade dos resultados para o nonanoato de etilo nas amostras de cachaça é muito maior quando comparada com a variabilidade dos resultados para o mesmo composto nas amostras de aguardente de cana-de-açúcar de Cabo Verde, contribuindo este facto (tal como para o caso do octanoato de etilo) para que as duas variedades de aguardente de cana-de-açúcar não sejam significativamente diferentes no que concerne aos teores de nonanoato de etilo.

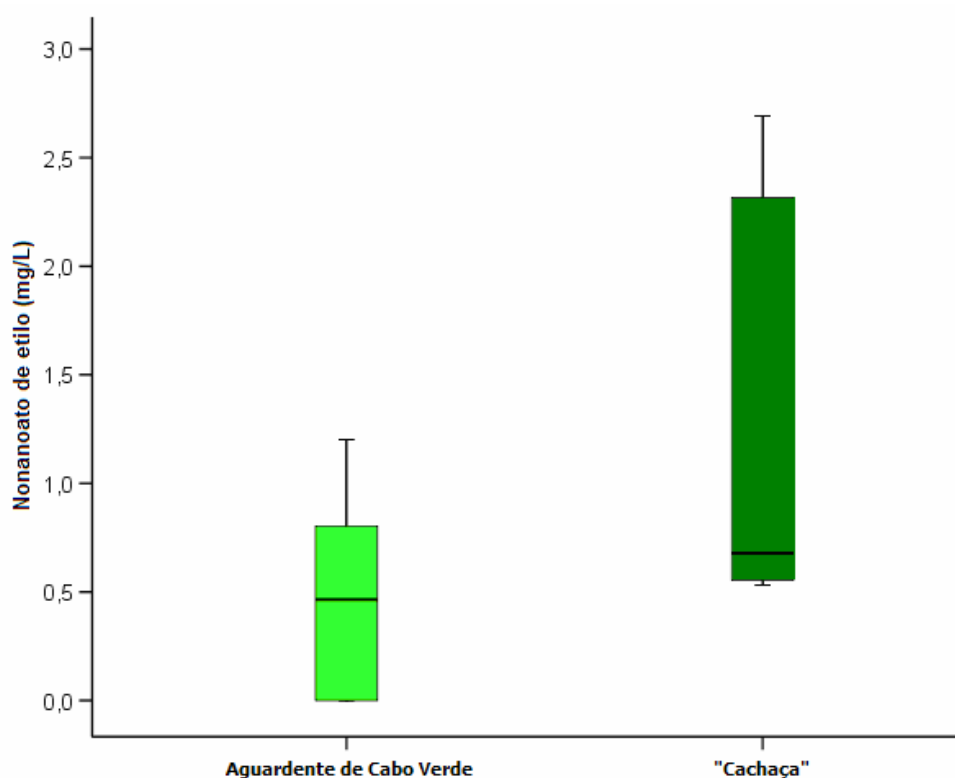


Fig. 5.8 – Gráfico de caixa para a concentração do nonanoato de etilo.

5.2.2.2.5 – Oleato de etilo

Finalmente, em relação ao oleato de etilo, pode-se verificar também pela observação do respectivo gráfico de caixa (Fig. 5.9) que a concentração do mesmo também não é significativamente diferente nos dois tipos de aguardente de cana-de-açúcar em estudo, verificando-se neste caso, que a variabilidade dos resultados para o oleato de etilo nas amostras de aguardente de cana-de-açúcar de Cabo Verde é relativamente grande quando comparada com a variabilidade dos resultados para o mesmo composto nas amostras de cachaça.

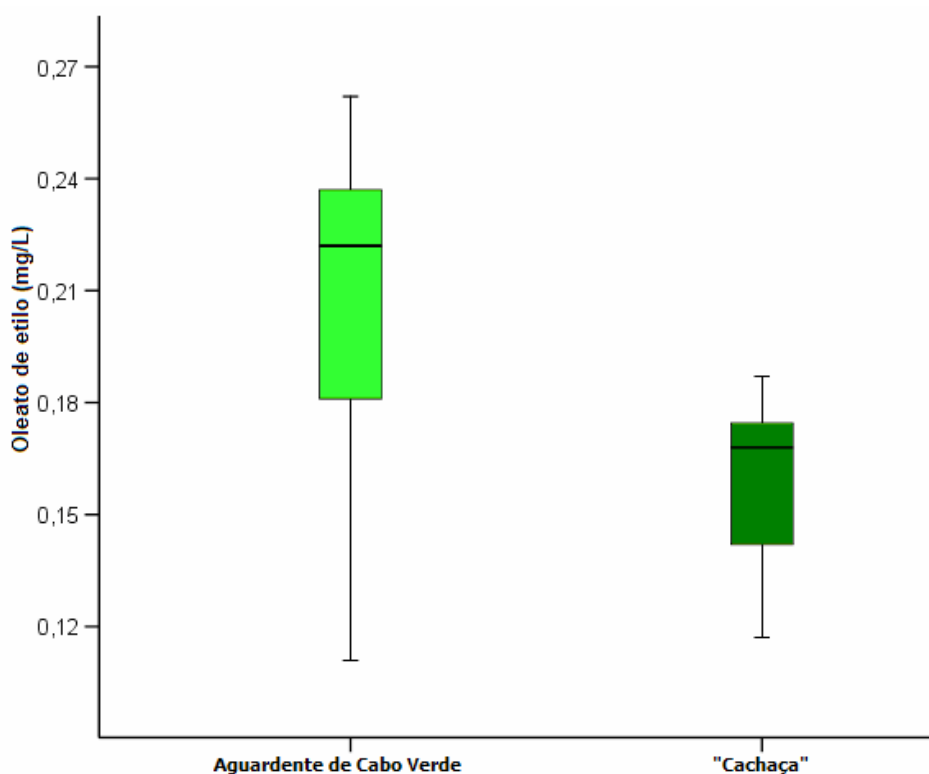


Fig. 5.9 – Gráfico de caixa para a concentração de oleato de etilo.

5.2.2.3 – Análise Multivariada

A análise multivariada permite determinar a existência ou não de grupos distintos por parte das duas variedades de aguardentes de cana-de-açúcar em estudo, tendo em conta as concentrações de todos os compostos em estudo. Contudo, é interessante notar que a simples representação gráfica das amostras em função das respectivas concentrações do álcool isoamílico (Fig. 5.10) permite uma clara diferenciação dos dois tipos de aguardentes de cana-de-açúcar em estudo em dois grupos (A = aguardente de cana-de-açúcar de Cabo Verde e B = cachaça), tal como já se deduzia da Fig. 5.5.

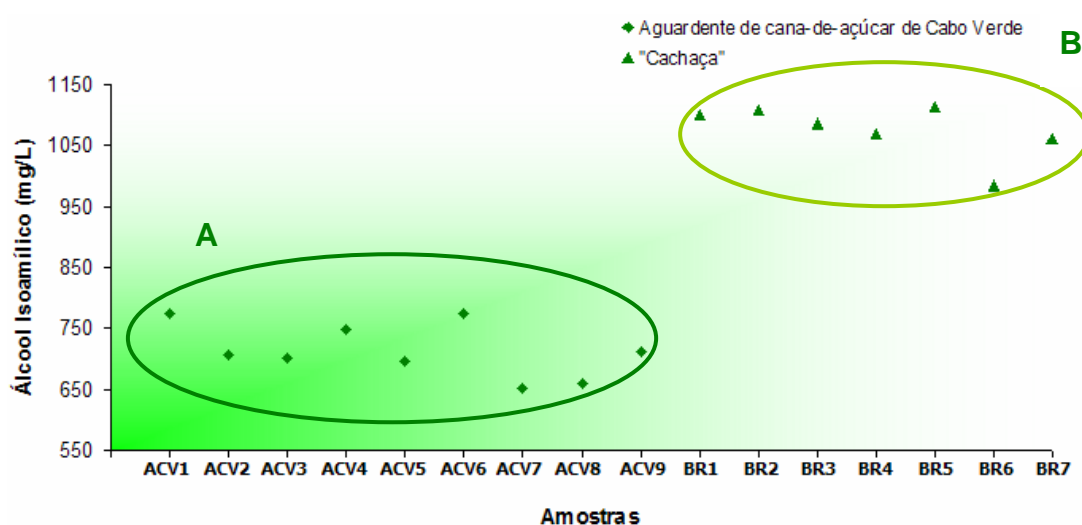


Fig. 5.10 – Representação gráfica das concentrações do álcool isoamílico nas amostras de aguardente de cana-de-açúcar.

5.2.2.3.1 – Análise em Componentes Principais

Analisando as médias e os desvios-padrão dos dados obtidos (Tabela 5.9) constata-se facilmente que os mesmos apresentam valores muito discrepantes, podendo-se proceder à normalização dos mesmos através de:

$$q_{ij} = \frac{x_{ij} - \bar{x}_j}{sd} \quad (1)$$

Onde,

q_{ij} = valor normalizado;

x_{ij} = valor original da matriz de dados experimentais;

\bar{x}_j = média aritmética da variável j ;

sd = desvio padrão.

Tabela 5.9 – Tabela original dos resultados obtidos com as médias e desvios-padrão.

Amostras	Código	Álcool Isoamílico (mg/L)	Hexanoato de etilo (mg/L)	Octanoato de etilo (mg/L)	Nonanoato de etilo (mg/L)	Oleato de etilo (mg/L)
ACA-CV	ACV1	776,1	1,267	1,288	0,804	0,184
ACA-CV	ACV2	705,6	1,673	3,086	0**	0,222
ACA-CV	ACV3***	701,2	4,377	1,160	0,464	0,262
ACA-CV	ACV4	748,3	2,682	1,305	1,192	0,137
ACA-CV	ACV5	697,2	2,544	1,444	1,202	0,111
ACA-CV	ACV6	775,0	1,252	1,171	0,638	0,181
ACA-CV	ACV7	652,7	1,682	2,868	0**	0,249
ACA-CV	ACV8	660,5	1,734	2,737	0**	0,222
ACA-CV	ACV9***	712,2	4,402	1,226	0,459	0,237
Cachaça	BR1	1101,4	2,091	4,423	2,691	0,171
Cachaça	BR2	1107,5	2,119	4,922	2,316	0,123
Cachaça	BR3	1088,0	1,316	1,358	0,550	0,187
Cachaça	BR4	1069,6	1,556	1,534	0,533	0,178
Cachaça	BR5	1114,1	1,879	4,108	2,317	0,117
Cachaça	BR6	985,5	1,462	1,555	0,558	0,168
Cachaça	BR7	1061,2	1,328	1,645	0,678	0,161
Média		872,3	2,085	2,239	0,900	0,182
Desvio-Padrão		189,9	0,996	1,282	0,845	0,047

ACA-CV = Aguardente de cana-de-açúcar de Cabo Verde.

**Concentrações abaixo do *Limite de Detecção* foram assumidas como sendo iguais a zero.

*** Amostras desprezadas na Análise em Componentes Principais (apresentam valores anómalos ("outliers") no que concerne à concentração do hexanoato de etilo).

Utilizando softwares de análise multivariada (por exemplo, Matlab™ 7.0 ou Minitab™ 14.0) pode-se obter a matriz da covariância, e a partir da mesma, os valores próprios (Tabela 5.10) e a percentagem da variância explicada por cada um dos mesmos.

Tabela 5.10 – Componentes principais, respectivos valores próprios e % de variância explicada.

PC	Valores próprios	% Variância explicada	% Variância acumulada
1	2,6773	53,55	53,55
2	1,1727	23,45	77,00
3	0,9025	18,05	95,05
4	0,1553	3,11	98,16
5	0,0922	1,84	100,00
Soma	5,000		

Estão referenciados vários critérios (Fleck *et al.*, 1998) (como os discriminados abaixo) que visam determinar quantos componentes principais deve-se eliminar de uma determinada análise:

1 – Representar graficamente os valores próprios em função dos componentes principais. Quando os valores próprios diminuem e a curva passa a ser quase paralela ao eixo das abcissas (em que se atinge um patamar), excluem-se os componentes correspondentes;

2 – Incluir os componentes principais que explicam a maior parte da variabilidade (mais de 70% da variância total);

3 – Critério de Kaiser (o mais utilizado): Exclui os componentes principais cujos valores próprios são inferiores a 1, no caso de se usarem valores normalizados.

Assim sendo, pela observação da Tabela 5.10 pode-se verificar que os dois primeiros componentes principais explicam a maior parte da variância total (77 %), uma vez que provêm de uma matriz normalizada e são os únicos cujos valores próprios são superiores a 1. Contudo, verifica-se também que ao incluir o terceiro componente principal, a percentagem de variância explicada aumenta para 95,05%.

Desta forma, retendo os três primeiros componentes principais, reduz-se o número de variáveis de 5 para 3 (com pouca perda de informação).

A Figura 5.11 faz a representação gráfica da relação entre os componentes ("scree-plot").

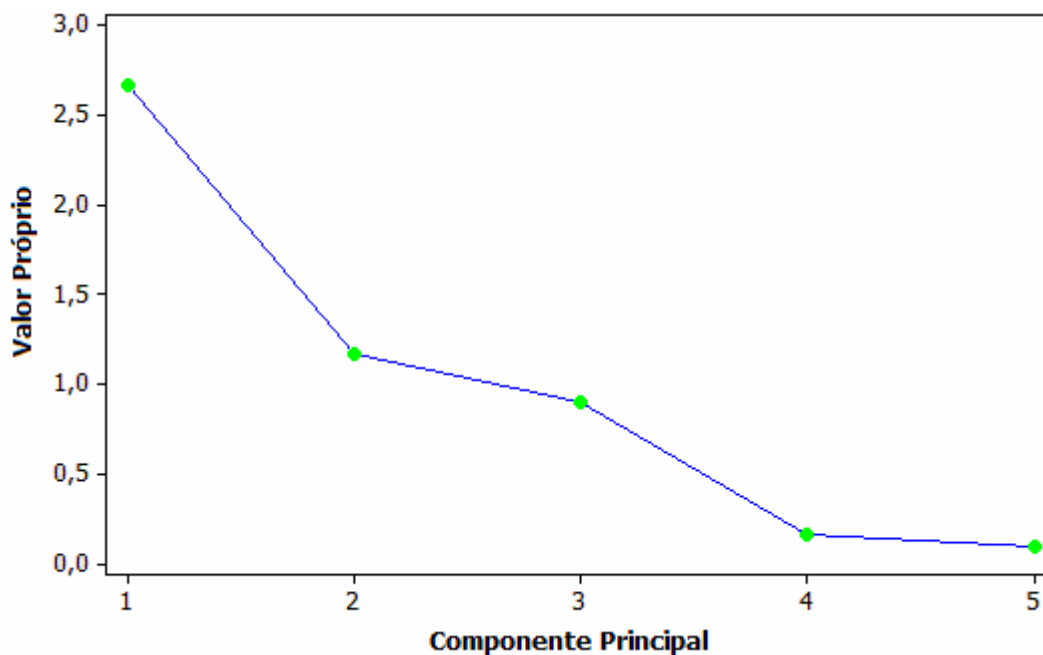


Fig. 5.11 – Representação gráfica da relação entre os componentes.

A partir dos mesmos softwares (Matlab™ 7.0 e Minitab™ 14.0) pode-se obter também os pesos ("loadings") (Fig. 5.12) para os três primeiros componentes principais (os pesos para os restantes componentes não retidos, encontram-se em anexo (Anexo 1).

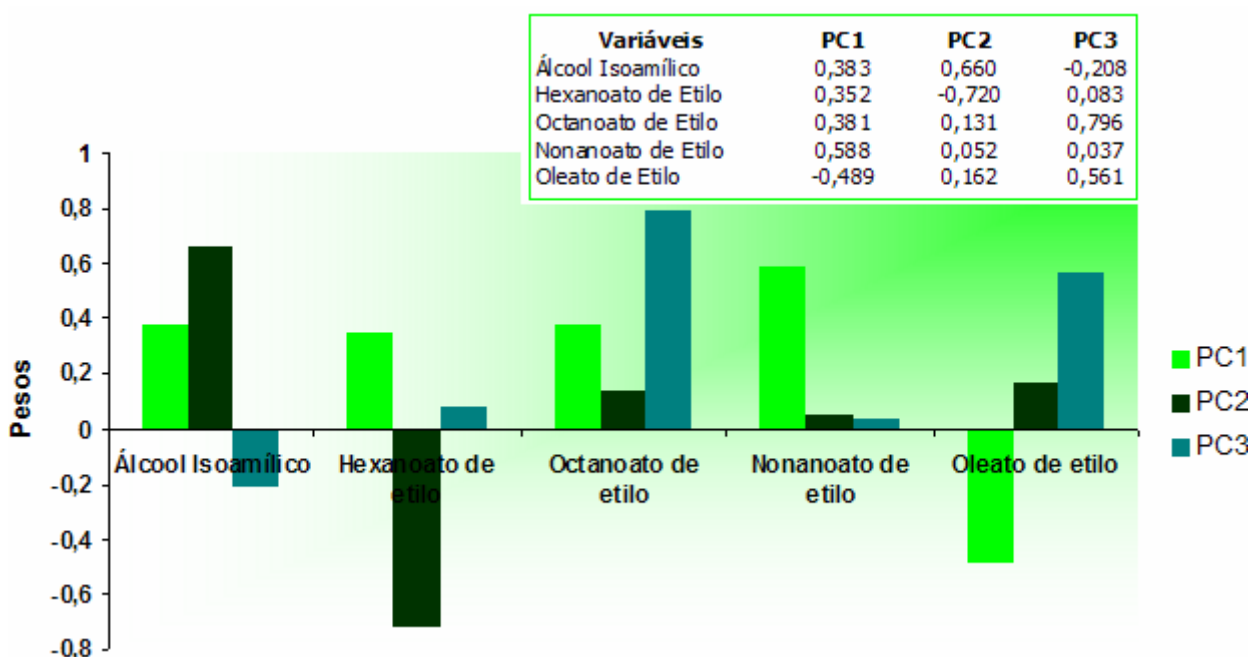


Fig. 5.12 – Pesos ("loadings") para os três primeiros componentes principais.

O primeiro vector próprio representa o eixo para o qual a variância dos resultados é maior, diminuindo para o segundo vector. Cada amostra possui assim, três componentes principais, PC1, PC2 e PC3.

O componente principal, para cada amostra é calculado com base no produto do peso (*"loading"*) de uma variável pelo valor dessa variável na amostra:

$$PCn = \sum_{i=1}^5 w_i p_i \quad (2)$$

Onde,

w – peso (*"loading"*) de uma variável;

p – valor da variável na amostra.

A Tabela 5.11 apresenta os *scores* para os três componentes principais para as 14 amostras de aguardente de cana-de-açúcar.

Tabela 5.11 – *Scores* para o primeiro, segundo e terceiro componente principal para as 14 amostras de aguardente de cana-de-açúcar.

Amostra	Código	PC1	PC2	PC3
ACA-CV	ACV1	-1,18	0,28	-0,47
ACA-CV	ACV2	-1,47	-0,32	1,25
ACA-CV	ACV4	0,67	-2,19	-0,80
ACA-CV	ACV5	0,82	-2,24	-1,04
ACA-CV	ACV6	-1,30	0,27	-0,60
ACA-CV	ACV7	-1,95	-0,43	1,55
ACA-CV	ACV8	-1,62	-0,60	1,11
Cachaça	BR1	2,41	0,48	1,14
Cachaça	BR2	2,92	0,30	0,76
Cachaça	BR3	-0,70	1,28	-0,73
Cachaça	BR4	-0,41	0,82	-0,69
Cachaça	BR5	2,59	0,59	0,13
Cachaça	BR6	-0,50	0,64	-0,74
Cachaça	BR7	-0,28	1,11	-0,87

Retendo os três primeiros componentes principais e sabendo os respectivos *scores* para as 14 amostras de aguardente de cana-de-açúcar, pode-se fazer uma representação gráfica (Fig. 5.13):

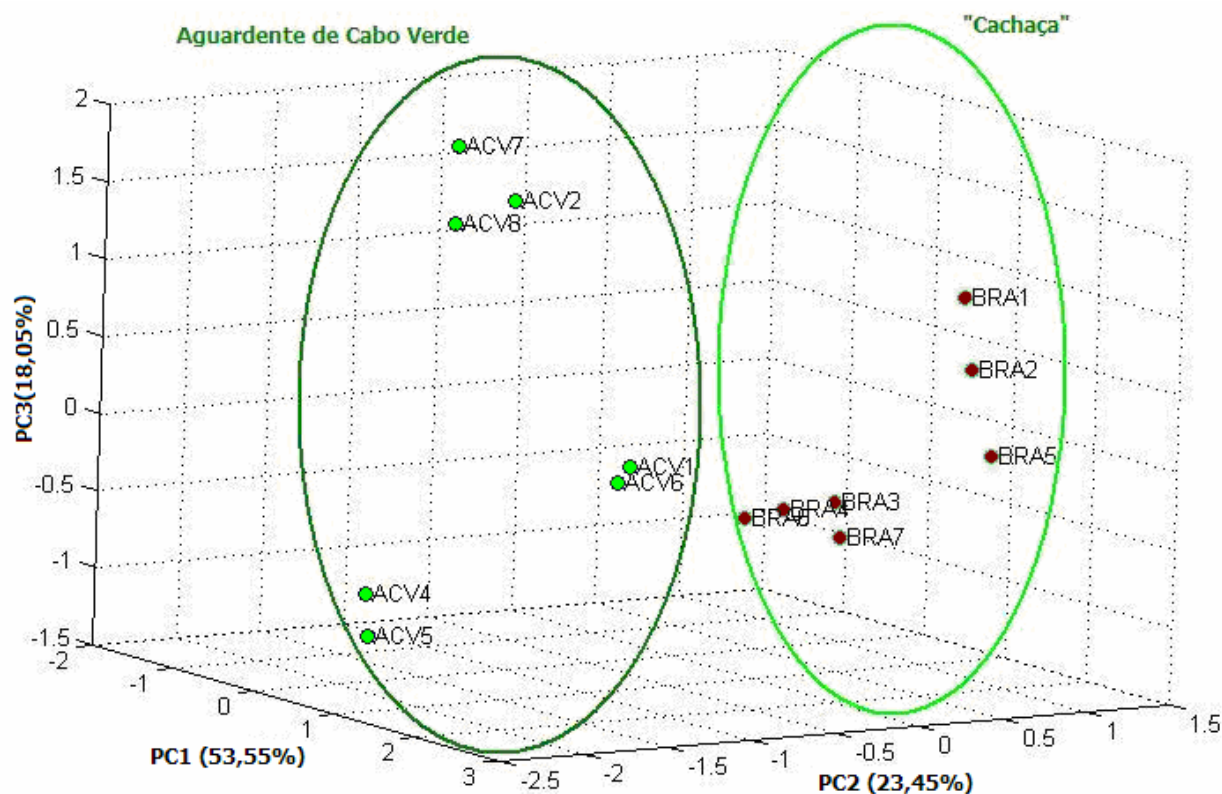


Fig. 5.13 – Representação gráfica de PC1 vs PC2 vs PC3.

Pela observação da Fig. 5.13, constata-se que a representação tridimensional do primeiro componente principal em função do segundo e terceiro componente principal mostra uma perceptível separação dos dois tipos de aguardente de cana-de-açúcar em estudo (se imaginarmos um plano imaginário entre os mesmos, encontrando o conjunto de amostras de aguardente de cana-de-açúcar de Cabo Verde num lado do plano e o conjunto de amostras de cachaça noutro lado do plano).

A razão para o facto das amostras de aguardente de cana-de-açúcar de Cabo Verde estarem um pouco dispersas estará relacionada com algumas especificidades no que concerne ao processo de produção inerentes a cada agricultor e com a qualidade da água utilizada na produção de aguardente de cana-de-açúcar de Cabo Verde.

5.2.2.3.2 – Análise Hierárquica de Grupos

No sentido de verificar se os resultados da Análise em Componentes Principais são corroborados, realizou-se a Análise Hierárquica de Grupos (Tabela 5.12 e Fig. 5.14), utilizando o *método do vizinho mais afastado* (também conhecido pelo método de "complete linkage" ou "furthest neighbour") e distância euclidiana. Na Análise de Hierárquica de Grupos desprezou-se, tal como na Análise em Componentes Principais, as amostras ACV3 e ACV9.

A Análise Hierárquica de Grupos foi realizada recorrendo ao *software* de análise multivariada Minitab™ 14.0.

Tabela 5.12 – Análise Hierárquica de Grupos para as amostras de aguardente de cana-de-açúcar em estudo.

N.º Observações	Soma dos Quadrados ("Intra-grupo")	Distância Média do Centróide	Distância Máxima do Centróide
14	478062	179,424	243,176

A matriz das distâncias e as diferentes interações realizadas encontram-se em anexo (Anexo 2).

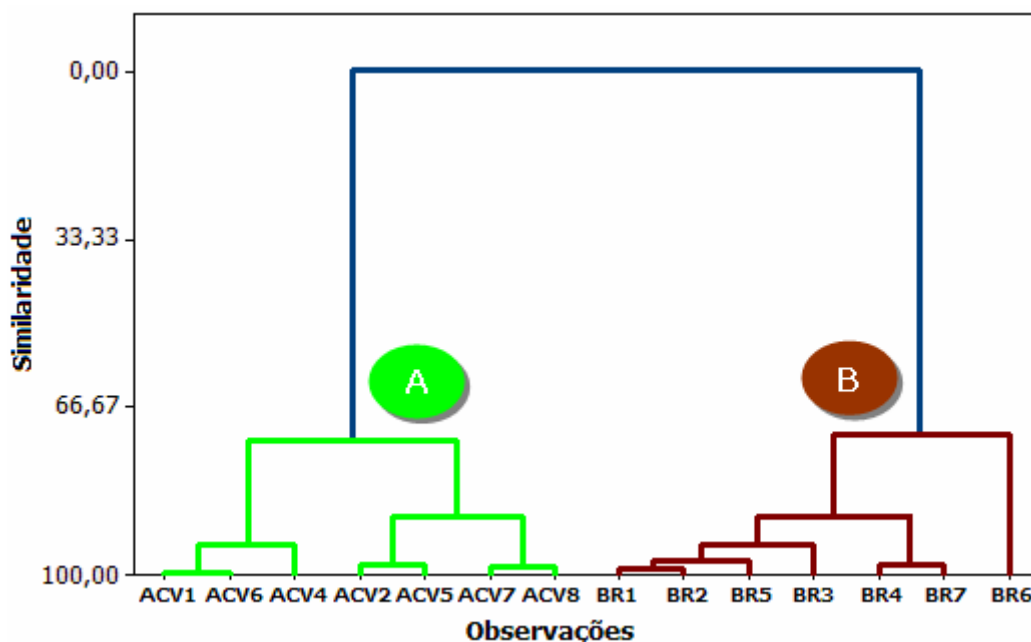


Fig. 5.14 – Dendrograma obtida pela Análise Hierárquica de Grupos para as amostras de aguardente de cana-de-açúcar em estudo.

A Análise Hierárquica de Grupos (*método do vizinho mais afastado; distância euclidiana*) mostra uma clara separação das aguardentes de cana-de-açúcar em estudo em dois grupos nitidamente distintos. O Grupo A é formado exclusivamente por amostras de aguardente de cana-de-açúcar de Cabo Verde enquanto que o Grupo B é formado exclusivamente por amostras de aguardente de cana-de-açúcar brasileira.

Pela observação do dendograma obtido pela Análise Hierárquica de Grupos, denota-se a presença de vários subgrupos (*"sub-clusters"*). Por exemplo verifica-se (tal como se deduzia da Análise em Componentes Principais), que as amostras ACV1 e ACV6 (amostras da mesma região) e amostras BR1, BR2 e BR5 (amostras da mesma marca comercial) formam subgrupos. Entretanto, as amostras ACV4 e ACV5, que na Análise em Componentes Principais tendiam a formar um subgrupo, apresentam-se na aqui em subgrupos diferentes.

Os resultados da Análise em Componentes Principais e da Análise Hierárquica de Grupos dão uma nítida indicação (tal como a representação gráfica da concentração do álcool isoamílico nas amostras em estudo) de que as amostras de aguardente de cana-de-açúcar de Cabo Verde em estudo poderão ter, de facto, características significativamente diferentes das amostras de cachaça.

Capítulo 6

Conclusões e Considerações Finais

Não obstante ao facto de existirem vários estudos publicados referentes à aguardente de cana-de-açúcar brasileira ("cachaça"), não existia até ao momento, nenhum estudo referente à aguardente de cana-de-açúcar de Cabo Verde, o qual aparenta ter características diferentes da cachaça no que concerne ao aroma.

Assim, este trabalho permitiu não só identificar os compostos voláteis presentes no "*head-space*" da aguardente de cana-de-açúcar de Cabo Verde responsáveis pelo seu aroma como também quantificar cinco dos citados compostos voláteis.

Este trabalho permitiu também identificar alguns compostos voláteis responsáveis pelo aroma da cachaça não referenciados como fazendo parte do "*head-space*" da mesma em dois (Nonato *et al.* (2001) e Nóbrega (2003) dos estudos mais importantes sobre a mesma. Contudo, a maioria desses compostos identificados neste presente estudo e não referenciados nos estudos citados, já foram referenciados como fazendo parte do "*head-space*" de outras bebidas espirituosas.

Tal como para o caso da aguardente de cana-de-açúcar de Cabo Verde, este trabalho permitiu quantificar também cinco compostos no "*head-space*" da aguardente de cana-de-açúcar brasileira.

Em relação às condições de análise adaptadas e melhoradas, poder-se-á concluir que as mesmas foram capazes de providenciar a identificação de uma vasta gama de compostos voláteis presentes no "*head-space*" das aguardentes de cana-de-açúcar em estudo.

Os resultados obtidos no presente estudo dão uma clara indicação de que a aguardente de cana-de-açúcar de Cabo Verde poderá ter características próprias, distintas da aguardente de cana-de-açúcar brasileira, nomeadamente a concentração média do álcool isoamílico no "*head-space*", que aparenta ser significativamente menor, quando comparado com a concentração média do mesmo composto no "*head-space*" da cachaça.

Como de entre os compostos que mais influenciam o aroma da aguardente de cana-de-açúcar (para além dos ésteres etílicos, dos quais se incluem os compostos estudados), se encontra o álcool isoamílico, é razoável assumir e concluir que o aroma da

aguardente de cana-de-açúcar de Cabo Verde poderá, em certa medida, ser significativamente diferente do aroma da aguardente de cana-de-açúcar brasileira.

Tal como referido em vários estudos, os resultados obtidos no presente estudo, permitem concluir que o álcool isoamílico é o composto dominante no "*head-space*" da aguardente de cana-de-açúcar, estando em concentrações muito maiores relativamente aos outros compostos, nomeadamente os ésteres em estudo.

Os resultados obtidos mostram e permitem concluir que as médias das concentrações no "*head-space*" de quatro (hexanoato de etilo, octanoato de etilo, nonanoato de etilo e oleato de etilo) dos cinco compostos químicos em estudo não são significativamente diferentes nos dois tipos de aguardente de cana-de-açúcar em estudo.

Em relação à análise multivariada, poder-se-á concluir que a Análise em Componentes Principais foi capaz de providenciar uma diferenciação dos dois tipos de aguardente de cana-de-açúcar em estudo. Do mesmo modo, a Análise Hierárquica de Grupos foi também capaz de distinguir as amostras de aguardente de cana-de-açúcar de Cabo Verde de amostras de aguardente de cana-de-açúcar brasileiras, verificando-se pelo dendograma obtido através deste último, a formação de dois grupos distintos e nitidamente separados, um formado por amostras de aguardente de cana-de-açúcar de Cabo Verde e outro formado por amostras de aguardente de cana-de-açúcar brasileiras.

Os resultados da Análise em Componentes Principais e da Análise de Grupos mostram e permitem concluir que a análise instrumental conjugada com a análise multivariada poderá ser uma importante "*ferramenta*" para diferenciação das duas bebidas variedades de aguardente.

Não obstante as óbvias vantagens da análise multivariada, os resultados mostram e permitem concluir também que, devido à significativa diferença entre a aguardente de cana-de-açúcar de Cabo Verde e a aguardente de cana-de-açúcar brasileira no que concerne ao teor de álcool isoamílico, uma simples representação gráfica das amostras em função do teor de álcool isoamílico, permite diferenciar os dois tipos de aguardentes de cana-de-açúcar.

O facto de alguns compostos terem sido encontrados no "*head-space*" da aguardente de cana-de-açúcar de Cabo Verde e não terem sido encontrados no "*head-space*" de várias amostras de aguardente de cana-de-açúcar brasileira, faz com que seja razoável presumir que alguns compostos voláteis presentes no "*head-space*" da aguardente de cana-de-açúcar de Cabo Verde sejam mais comuns no mesmo do que no "*head-space*" da aguardente de cana-de-açúcar brasileira.

A presença de 6,10,14-Trimetil-2-pentadecanona (composto já identificado em vários vinhos tintos) no "*head-space*" da aguardente de cana-de-açúcar de Cabo Verde e a sua ausência no "*head-space*" das amostras de aguardente de cana-de-açúcar brasileira em estudo poderá ser uma indicação nesse sentido. Isto porque, o citado composto não só não foi detectado no presente no estudo como fazendo parte do "*head-space*" das aguardentes de cana-de-açúcar brasileiras em estudo, como também não se encontra referido nos principais estudos sobre a cachaça, como fazendo parte do "*head-space*" da mesma.

É no mínimo reconhecível a aplicabilidade e importância prática deste estudo como um primeiro passo para um estudo mais aprofundado da aguardente de cana-de-açúcar de Cabo Verde, quantificando alguns compostos típicos detectados no presente estudo no "*head-space*" da mesma e outros que, embora não sendo típicos, possam estar em concentrações significativamente diferentes de concentrações encontradas no "*head-space*" de aguardentes produzidas em outras paragens, como a aguardente de cana-de-açúcar brasileira.

Actualmente, tem-se exemplo de várias bebidas alcoólicas produzidas em determinadas regiões (como certos vinhos produzidos em regiões demarcadas) cujas características são de facto reconhecidas, baseando em diversos estudos científicos, como sendo únicas, próprias e inerentes ao facto de dessas bebidas terem sido produzidas de uma forma peculiar ou com matéria-prima própria dessa determinada região.

Assim sendo, este presente estudo poderá ser o início de um caminho mais longo, que com os esforços adequados, poderá culminar com o reconhecimento (com as óbvias vantagens económicas que poderiam advir do mesmo, nomeadamente para os vários produtores de aguardente de cana-de-açúcar das ilhas de Santiago e Santo Antão) da aguardente de cana-de-açúcar de Cabo Verde, como uma aguardente única com características próprias no que concerne ao aroma, advenientes da forma específica em que é produzida e do tipo de matéria-prima utilizada.

De facto é de realçar que tanto quanto se sabe, as características do solo e o próprio clima podem influenciar significativamente as características de uma determinada matéria-prima. Em Cabo Verde, o clima é de longe diferente do clima do Brasil, com precipitações em apenas alguns períodos do ano (não mais de três meses), podendo alternar com longos períodos de seca cíclica.

Assim sendo, tal como acontece com outras matérias-primas destinadas à produção de outras bebidas alcoólicas (como os vinhos por exemplo), o próprio clima

pode influenciar significativamente a própria composição do caule da cana-de-açúcar de Cabo Verde, dando-a características próprias, distintas de canas-de-açúcar provenientes de outros países, como por exemplo, o Brasil.

Referências Bibliográficas

- Almeida, M. E. W. de; Barreto, H. H. C. Álcoois superiores em aguardente de cana por cromatografia em fase gasosa. *R. Inst. Adolfo Lutz*, v.31 (1971) 117±124.
- Arvanitoyannis, I.S.; Katsota, M.N.; Psarra, E.P.; Soufleros, E.H.; Kallithraka, S. Application of quality control methods for assessing wine authenticity: Use of multivariate Analysis (Chemometrics). *Trends in Food Science & Technology* 10 (1999) 321-336.
- Boscolo, Maurício; Bezerra, Cícero W. B.; Cardoso, Daniel R.; Neto, Benedito S. Lima; Franco, Douglas W. Identification and Dosage by HRGC of Minor Alcohols and Esters in Brazilian Sugar-Cane Spirit. *J. Braz. Chem. Soc.* Vol. 11 Nº 1 (2000) 86-90.
- Buratti, S.; Benedetti, S.; Scampicchio, M.; Pangerod, E.C. Characterization and classification of Italian Barbera wines by using an electronic nose and an amperometric electronic tongue. *Analytica Chimica Acta* 525 (2004) 133–139.
- Câmara, José; Alves, M. Arminda; Marques, José C. Multivariate analysis for the classification and differentiation of Madeira wines according to main grape varieties. *Talanta* 68 (2006) 1512–1521.
- Cardello, Helena M. A. B.; Faria, João B. Análise Descritiva Quantitativa da aguardente de cana durante o envelhecimento em tonel de carvalho (*Quercus alba* L.). *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 18 (3) (1998) 169-175.
- Cardoso, Daniel R.; Bettin, Sandra M.; Reche, Roni V.; Lima-Neto, Benedito S.; Franco, Douglas W. HPLC–DAD analysis of ketones as their 2,4 dinitrophenylhydrazones in Brazilian sugar-cane spirits and rum. *Journal of Food Composition and Analysis* 16 (2003) 563-573.

- ✚ Christensen, Jan H.; Mortensen, John; Hansen, Asger B.; Andersen, Ole. Chromatographic preprocessing of GC–MS data for analysis of complex chemical mixtures. *Journal of Chromatography A*, 1062 (2005) 113-123.
- ✚ Cordoba, Belinda Vallejo; Córdova, Aarón Fernando González; Montoya, Maria del Carmen Estrada. Tequila Volatile Characterization and Ethyl Ester Determination by Solid Phase Microextraction Gas Chromatography/Mass Spectrometry Analysis. *J. Agric. Food Chem.* 52, (2004) 5567-5571.
- ✚ Delgado, Miguel A. R.; Hernández, Guillermo G.; González, José E. C.; Trujillo, Juan Pedro P. Principal component analysis of the polyphenol content in young red wines. *Food Chemistry* 78 (2002) 523–532.
- ✚ Exarchou, Vassiliki; Fiamegos, Yiannis C.; van Beek, Teris A.; Nanos, Christos; Vervoort, Jacques. Hyphenated chromatographic techniques for the rapid screening and identification of antioxidants in methanolic extracts of pharmaceutically used plants; *Journal of Chromatography*, 2005 (In press).
- ✚ Fernandes, Andréa P.; Santos, Mirian C.; Lemos, Sherlan G.; Ferreira, Márcia M. C.; Nogueira, Ana Rita A.; Nóbrega, Joaquim A. Pattern recognition applied to mineral characterization of Brazilian coffees and sugar-cane spirits. *Spectrochimica Acta Part B* 60 (2005) 717– 724.
- ✚ Ferrari, Gérald; Lablanque, Odile; Cantagrel, Roger; Ledauphin, Jérôme; Payot, Thierry; Fournier, Nicole; Guichard, Elisabeth. Determination of Key Odorant Compounds in Freshly Distilled Cognac Using GC-O, GC-MS, and Sensory Evaluation. *J. Agric. Food Chem.* 52, (2004) 5670-5676
- ✚ Fleck, Marcelo P.A.; Bourdel, Marie C. Method of simulation and choice of factors in the analysis of principal components. *Rev. Saúde Pública* 32 (3) (1998): 267-72.
- ✚ Gómez, Maria del Mar C.; Feldmann, Ingo; Jakubowski, Norbert; Andersson, Jan T. Classification of German White Wines with Certified Brand of Origin by

- Multielement Quantitation and Pattern Recognition Techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52 (2004) 2962-2974.
- ✚ Gyorgy, Vas; Vékey, Károly. Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. *Journal of Mass Spectrometry* (2004); 39: 233–254.
- ✚ Kallithraka, S.; Arvanitoyannis, I. S.; Kefalas, P.; El-Zajouli, A.; Soufleros, E.; Psarra, E. Instrumental and sensory analysis of Greek wines; implementation of principal component analysis (PCA) for classification according to geographical origin. *Food Chemistry* 73 (2001), 501-514.
- ✚ Kite, G.C.; Veitch, N.C.; Grayer, R.J.; Simmonds, M.S.J. The use of hyphenated techniques in comparative phytochemical studies of legumes. *Biochemical Systematics and Ecology* 31 (2003) 813–843.
- ✚ Lachenmeier, Dirk W. Rapid quality control of spirit drinks and beer using multivariate data analysis of Fourier transform infrared spectra. *Food Chemistry* (2006), In Press.
- ✚ Lachenmeier, Dirk W.; Richling, Elke; López, Mercedes G.; Frank, Willi; Schreier, Peter. Multivariate Analysis of FTIR and Ion Chromatographic Data for the Quality Control of Tequila. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (2005), 2151-2157.
- ✚ Ledauphin, Jérôme; Guichard, Hugues; Saint-Clair, Jean Francois; Picoche, Bernard; Barillier, Daniel. Chemical and Sensorial Aroma Characterization of Freshly Distilled Calvados. 2. Identification of Volatile Compounds and Key Odorants. *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 433-442.
- ✚ Llistó, A. M. S. M.; Souza, L. G.; Mischán, M. M. Alguns componentes do coeficiente não álcool das aguardentes de cana: ésteres. *Brasil Açucareiro*, v.5 (1979) 341-346.

- ✚ Mastelic, Josip; Jerkovic, Igor; Mesic, Milan. Volatile constituents from flowers, leaves, bark and wood of *Prunus mahaleb* L. *Flavour Fragr. J.* 2006; 21: 306–313.
- ✚ Miller, James N.; Miller, Jane C. - Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry. Fourth Edition. Pearson Education Limited, Great Britain, 2000.
- ✚ Milligan, G.W.; Cooper, M.C. A study of standardization of variables in *cluster* analysis. *J. Classification* 5 (1988) 181–204.
- ✚ Namara, Kevin Mac; Leardi, Riccardo; Sabuneti, Andrew. Fast GC analysis of major volatile compounds in distilled alcoholic beverages: Optimisation of injection and chromatographic conditions. *Analytica Chimica Acta* 542 (2005) 260-267.
- ✚ Nascimento, R. F.; Cardoso, D.R.; De Keukeleire, Denis; Lima-Neto, Benedito dos S.; Franco, Douglas W. Quantitative HPLC Analysis of Acids in Brazilian Cachaça and Various Spirits Using Fluorescence Detection of Their 9-Anthrylmethyl Esters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2000), 48, 6070-6073.
- ✚ Nieuwoudt, Helene H.; Prior, Bernard A.; Pretorius, Isak S.; Manley, Marena; Bauer, Florian F. Principal Component Analysis Applied to Fourier Transform Infrared Spectroscopy for the Design of Calibration Sets for Glycerol Prediction Models in Wine and for the Detection and Classification of Outlier Samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, (2004) 3726-3735.
- ✚ Nóbrega, Ian C. C. Análise dos compostos voláteis da aguardente de cana-de-açúcar por concentração dinâmica do "head-space" e cromatografia gasosa-espectrometria de massas. *Ciênc. Tecnol. Alim.* 23 (2) (2003) 210-216.
- ✚ Nonato, Eliana A.; Carazza, Fernando; Silva, Fernando C.; Carvalho, Ciomara R.; Cardeal, Zenilda de L. A Headspace Solid-Phase Microextraction Method for the Determination of Some Secondary Compounds of Brazilian Sugar Cane Spirits by Gas Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2001), 49, 3533-3539.

- ✚ Oliveira, Consuelo Ribeiro de ; Gariglio, Hélder A. de Aquino; Ribeiro, Morgana Menezes; Alvarenga, Miriam Souza Pinto de; Maia, Francisco Xavier – Cachaça de Alambique – Manual de Boas Práticas Ambientais e de Produção – Convênio de Cooperação Técnica SEAPA/SEMAD/AMPAQ/FEAM/IMA, Minas Gerais, 2005, 67 páginas.
- ✚ Schaffer, C.M.; Green, P.E.; An empirical comparison of variable standardization methods in *cluster* analysis. *Multivar. Behav. Res.* 31 (1996) 149–167.
- ✚ Seong, S. Chae; Warde, William D. Effect of using principal coordinates and principal components on retrieval of *clusters*. *Computational Statistics & Data Analysis* 50 (2006) 1407 – 1417.
- ✚ Souza, Maria D.C.A. de; Vásquez, Pablo; Del Mastro, Nelida L.; Acree, Terry E.; Lavin, Edward H. Characterization of Cachaça and Rum Aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2006), 54, 485-488.
- ✚ Pflieger, K.; Maurer, H. H.; Weber, A. A. – *Mass Spectral and GC Data of Drugs, Poisons, Pesticides and Their Metabolites. Second, Revised and Enlarged Edition. Part 4* – Wiley-VCH, Germany, 2000, 3022 páginas.
- ✚ Tsakiris, Argyris; Sipsas, Vasillios; Bekatorou, Argyro; Mallouchos, Athanasios; Koutinas, Athanasios. Red Wine Making by Immobilized Cells and Influence on Volatile Composition. *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004), 1357-1363.
- ✚ Valente, Antonio Luiz Pires; Augusto, Fabio. Microextração por Fase Sólida. *Química Nova* 23 (4) (2000).

Anexos

Anexo 1

1 – Análise em Componentes Principais

Análise da matriz da correlação

Valor Próprio	2,6773	1,1727	0,9025	0,1553	0,0922
Proporção	0,535	0,235	0,181	0,031	0,018
Cumulativo	0,535	0,770	0,951	0,982	1,000

Variável	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5
Álcool Isoamílico	0,383	0,660	-0,208	-0,612	0,008
Hexanoato de Etilo	0,352	-0,720	0,083	-0,583	0,105
Octanoato Etilo	0,381	0,131	0,796	0,103	-0,440
Nonanoato Etilo	0,588	0,052	0,037	0,420	0,689
Oleato Etilo	-0,489	0,162	0,561	-0,314	0,567

Anexo 2

1 – Análise de Grupos (“Clusters Analysis”)

Distância euclidiana; Método do Vizinho Mais Afastado (“*Complete Linkage*”); “Amalgamation Steps”.

Step	Number of clusters	Similarity level	Distance level	Clusters joined	Clusters cluster	Number of obs.	
						New cluster	in new cluster
1	13	99,7693	1,064	1	5	1	2
2	12	98,6759	6,109	8	9	8	2
3	11	98,3063	7,814	6	7	6	2
4	10	98,1934	8,335	11	14	11	2
5	9	98,1204	8,672	2	4	2	2
6	8	97,2459	12,706	8	12	8	3
7	7	94,3072	26,265	8	10	8	4
8	6	93,9671	27,834	1	3	1	3
9	5	88,5514	52,820	2	6	2	4
10	4	88,5227	52,952	8	11	8	6
11	3	73,2603	123,368	1	2	1	7
12	2	72,1200	128,629	8	13	8	7
13	1	0,0000	461,365	1	8	1	14

Final Partition

Number of clusters: 1

	Number of observations	Within cluster sum of squares	Average distance from centroid	Maximum distance from centroid
Cluster1	14	478062	179,424	243,176